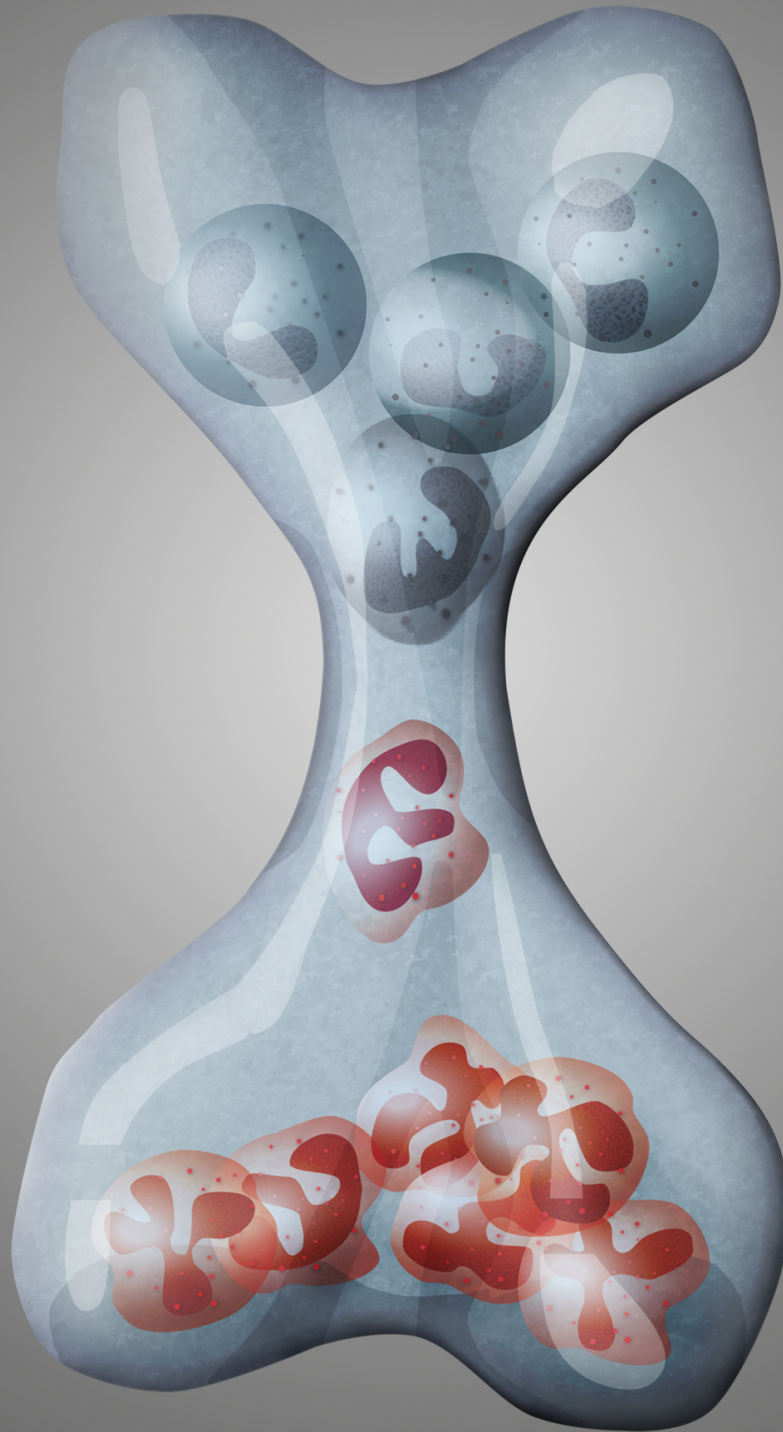


TESIS DOCTORAL

Caracterización de una población de neutrófilos
envejecidos y su efecto sobre nichos hematopoyéticos



María Casanova Acebes

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Celular y Genética



FACULTAD DE
CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE
NEUTRÓFILOS ENVEJECIDOS Y SU EFECTO SOBRE
NICHOS HEMATOPOYÉTICOS

TESIS DOCTORAL

María Casanova Acebes

Madrid, 2014



Memoria presentada por María Casanova Acebes, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

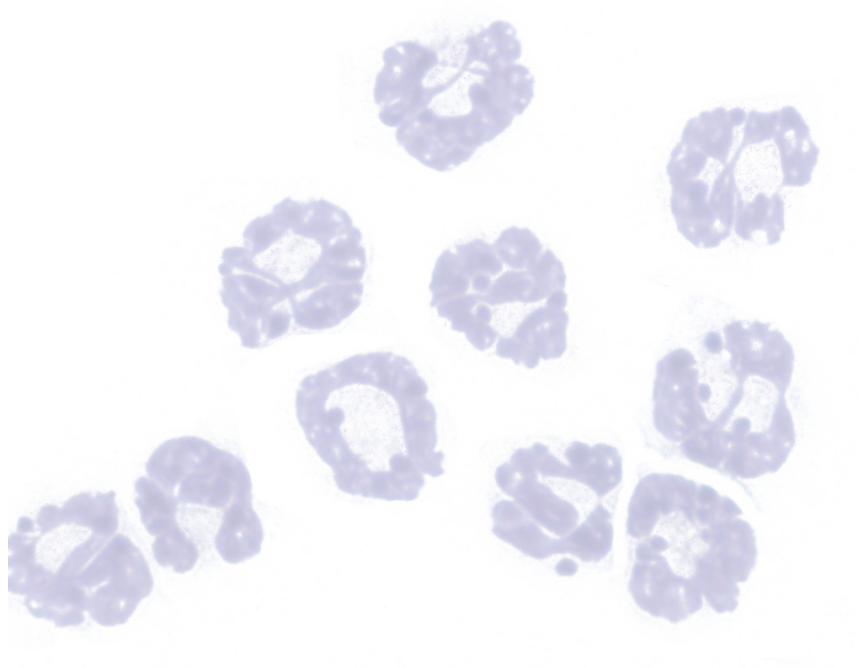
Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el laboratorio de Imagen de la Inflamación Cardiovascular y la Respuesta Inmune del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) bajo la dirección del Doctor Andrés Hidalgo Alonso.

Para su realización se contó con la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y de la Fundación ProCNIC del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

A mi madre

Tesis, del latín *thesis*, proposición o conclusión que se mantiene con razonamientos

Agradecimientos



Por fin, mira que ha sido necesario empezar tres tesis para acabar una. Pero bueno oye pues aquí está, -Sí señor (o señora)...el manuscrito final, el montaje del director.

Resulta muy complicado resumir toda la gente a la que hoy y siempre, les estaré agradecida por lo que significan en el día a día o en momentos precisos. Sin embargo, como dudo que escriba ningún otro libro en el que tenga esta oportunidad, me voy a quedar bien a gusto. Allá voy.

En primer lugar me gustaría dedicar este libro gordo de petete a las dos personas que me trajeron al mundo, a mis padres. Sin ellos y sin su esfuerzo durante todos estos años hoy no estaría aquí. Quiero daros las gracias por brindarme la oportunidad de estudiar y de hacerlo en la rama que más me apasiona, la biología. Especialmente quiero agradecer a mi madre su dedicación a nosotros, aún cuando eso ha supuesto un tremendo sacrificio para ella. Gracias mama, eres lo más grande! Igualmente quiero agradecer a mis hermanos su apoyo durante todos estos años, aunque les suena a chino lo que hago. No podría olvidar a las fans de mis cuñadas, Izaskun, Jenny y Patri. Y a lo más genial de este mundo, mis sobrinos Pablete y el recién llegado Nacho, y a las niñas de mis ojos mis sobrinas, Alejandra y Malena. Quiero agradecer también a mis tíos, al tío Paco y a la tía Amelia, porque son dos personas que me han inculcado el valor del esfuerzo y la pasión por el trabajo. Y a mis primos y primas, que están muy mal de la cabeza, pero les quiero igual.

Quiero agradecer enormemente su ayuda, apoyo y enseñanzas al doctor Hidalgo, qué narices, a Andrés. Gracias por darme la oportunidad de empezar el laboratorio contigo, y eternas gracias por los primeros años, en los que mano a mano empezamos este proyecto...han sido los años más bonitos y siempre los guardaré en mi memoria. Me emociono al pensar en momentos concretos, pero si tengo que escoger alguno me quedo con el circadiano en el que vimos que los neutrófilos envejecidos iban desapareciendo de sangre...fue el principio de una gran historia. Has sido el mejor mentor que nadie puede tener y sólo espero estar a la altura de lo que me has transmitido, pasión y juicio crítico. Te voy a echar de menos, boss.

A continuación, tengo que agradecer al motherfarmer es decir, a Christophillo mi compañero durante estos años. Gracias por ser como eres y por tus air guitar a las 20 de la tarde. No puedo poner por escrito tus mejores momentos

porque tu imagen quedaría comprometida, pero me quedo con esos.

Y desde luego, a Linnea. Porque es una persona de una calidad outstanding y me ha enseñado que la ciencia es emoción y precisión, a partes iguales. Gracias por compartir conmigo los circadianos más duros y por animarme siempre, por tu entusiasmo y alegría, y porque eres un fueguito.

Por supuesto a mis compis de laboratorio: a María Nácher, por ser un cielazo y todo bondad; a Vinatha por sus ánimos y alegría; a Juan por su paciencia y coñas; a Noe por sus coplas y eterna disposición para echarte una mano; y a la Verdú por sus locuras y consejos. Además gracias a las nuevas generaciones: José María, Angel, la Giorgi y la Pao, porque dan un aire fresco al laboratorio y con sus preguntas te descolocan. Un gran ole por este laboratorio!

A Casino Royale: Rapha, Carlos, Laia y Pedrito. Por los mejores años del DEAIC...lo que nos hemos reído! A Bea, la mami más guapa y más cariñosa (y no únicamente de Claudia!). Al DEAIC, compuesto por grandes personas: Eevita y Ana, dos rubias de traca. A Inés y Virgi, porque sin ellas nada de lo que está en esta tesis sería posible! Por su apoyo y sus: -vamos Mery! A María Jesús, por sus abrazos. A Javitón, por ser tan genuino. A Xemari, por sus Casanova diarios o sus bolas de papel...A Jaimito y Deivid, porque sáis geniales. Y al resto del Departamento, en especial a las niñas Cris, Marta y Albita, y a Punín, que amenizan las interminables horas en el cuarto de cultivos. Y a Cris Giménez, gracias por alegrarte con los éxitos de cada predoc del CNIC, nos vemos en NY! Por supuesto, gracias a toda la colonia de mis CXCR4 y mis malogrados Fut7. Siempre os llevaré conmigo PMG e IDH.

A mis profes de instituto, Ruth y Fuencisla, porque me enseñaron a ver más allá de los momentos concretos y me infectaron con el virus de la investigación. A Paloma y Stuart, por los años del GEB. A Mar y a Josete, compañeros de 6 Naciones y demás aventuras. A los Biolokos: al Rubito y a Anita, por estar siempre ahí...a Mariki, Sariplo, Patri, Viole, Pianista, San e Ío (Ro)... en el pasillo de Zoo aún se acuerdan de nosotros. A Belver y Pérez, porque durante todos estos años en el CNIO/CNIC han sido un apoyo importante. A las Bioterápicas: a Carmen, Belén, Virgi y en especial a Mayte, por creer en mi. Al tío Ligos, a Angel (la otra rubia) y al tío Megi, porque a parte de haberme invitado a unos cuantos cafés me han enseñado mucha ciencia (y no ciencia). A Mariano, Elvi y Raquelita, porque además de excelentes com-

pañeros son grandes personas! Y a Kiki, porque se te va mucho la olla. A mis antiguos compis de Merck, porque esta familia siga creciendo y las grandes comilonas nos sigan uniendo. Gracias en especial al amigo, a Vane y a Nines, por tantos buenos ratos entre robots y placas de bacterias.

No podría olvidarme agradecer al MINECO y al CNIC el apoyo económico que me ha permitido realizar mi labor investigadora durante estos años. Espero que otros tantos estudiantes puedan formarse como lo he hecho yo gracias a su financiación.

Me gustaría agradecer a Jorge López, Francisco Abad Santos y Cecilia Muñoz del Hospital Universitario de La Princesa, por su ayuda en la preparación de muestras de sangre para el análisis del perfil de neutrófilos envejecidos en humanos.

Gracias al laboratorio del Dr. Greg Lemke (esa Paki de moda, ay qué bien lo pasamos!) y de la Dra. Miriam Merad, donde pude hacer parte de los experimentos que se reflejan en esta tesis.

Al Cervantes de Adosinda y a Amalia, porque me han acogido como a uno más en su familia junto a las locas de las primas González! Y a Teresa, porque pariste un diamante en bruto.

A las boadillenses, porque son el núcleo duro y porque no hay mejor compañía que la vuestra. Me siento muy afortunada y orgullosa de teneros como amigas, ni en 3 tesis os podría agradecer vuestra amistad. Y A Víctor, que nos aguanta y creo que hasta disfruta con nosotras! Y a los Mongos, que me han acogido como a uno más aunque esté muy lejos de sus frikeces y a veces no os entienda. A los Avengers (o Bolundenguers Pamperos) porque nuestra amistad no necesita de grandes momentos, sólo de películas malas. A Fer, Xarito y Pablito, que son ya parte de nuestra familia.

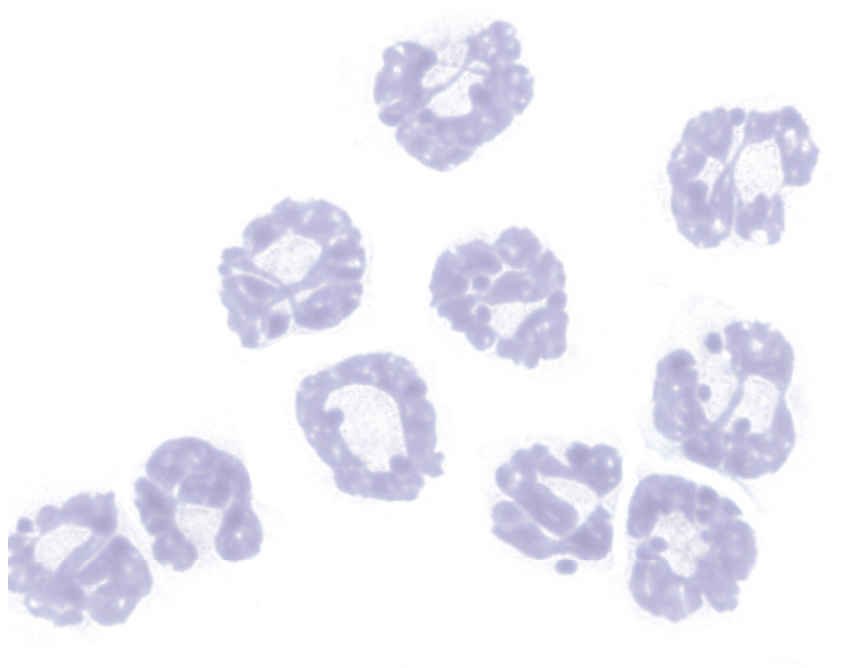
Y a Mauro, porque está en el día a día, y se lleva lo mejor (y lo peor) de la Rubia. Vos únicamente en el mundo...23.

ÍNDICE

Resumen	1-3
Introducción	5-35
Homeostasis de neutrófilos	7-23
1. Sistema inmune e inmunidad innata	7-8
1.1. Homeostasis e inflamación	9-10
2. Neutrófilos. Granulopoiesis y regulación de la producción de neutrófilos	10-16
2.1. Granulopoiesis en condiciones basales	11-13
2.2. Granulopoiesis de emergencia	13-16
3. Tráfico de neutrófilos	16-20
3.1. Cascada de reclutamiento de neutrófilos	16-18
3.2. Excepciones en la cascada de reclutamiento de neutrófilos	18-20
4. Envejecimiento y eliminación de neutrófilos	20-23
4.1 Eje CXCR4-CXCL12	21
4.2 Eje CXCR2-CXCL1	22
4.3 Eliminación de neutrófilos	22-23
Regulación del nicho hematopoyético.	24-35
1. El nicho hematopoyético en médula ósea.	24-33
1.1 Composición del nicho hematopoyético	25-29
1.2 Mecanismos de regulación del nicho hematopoyético de médula ósea	29-33
1.2.1 Tráfico de células madre y progenitores hematopoyéticos.	29-30
1.2.2 Regulación circadiana del nicho hematopoyético y del sistema inmune	30-33
2. Regulación remota del nicho hematopoyético de médula ósea y nichos en periferia: fagocitos y metabolismo lipídico.	34-35
Objetivos	37-39
Resultados	41-84
1) Identificación y caracterización del proceso de envejecimiento de neutrófilos.	43-51
1.1 Identificación de neutrófilos envejecidos en circulación.	43-47
1.2 Caracterización fenotípica y molecular de neutrófilos envejecidos en circulación.	47-50
1.3 Migración de neutrófilos envejecidos a médula ósea.	51
2) Eliminación de neutrófilos en médula ósea y regulación del nicho hematopoyético.	52-67
2.1 Modulación local del nicho hematopoyético por neutrófilos envejecidos.	53-59
2.2 Mediadores moleculares y celulares de la regulación del nicho hematopoyético: macrófagos residentes, células productoras de CXCL12 y receptores nucleares LXR.	60-65
2.3 Eliminación de neutrófilos envejecidos en médula ósea y regulación del tráfico de progenitores hematopoyéticos.	65-67

3) Eliminación de neutrófilos en periferia y regulación remota del nicho hematopoyético.	67-84
3.1 Clearance de neutrófilos en periferia	67-70
3.2 Desregulación del tráfico de progenitores hematopoyéticos en animales con tráfico deficiente de neutrófilos.	70-71
3.3 Control remoto del nicho hematopoyético en periferia.	71-75
3.4 Modulación de nichos hematopoyéticos periféricos.	76-78
3.5 Control circadiano del tráfico de progenitores hematopoyéticos.	78-84
Discusión	85-10
1. Envejecimiento de neutrófilos.	88-91
2. Eliminación de neutrófilos en el organismo.	91-98
3. Modulación del nicho hematopoyético por eliminación de neutrófilos	98-104
Conclusiones	107-109
Materiales y Métodos	111-132
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	113
2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS DE MÉDULA ÓSEA Y SANGRE	114-115
3. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES MIELOIDES Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	116-117
4. RECONSTITUCIÓN HEMATOPOYÉTICA POR TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA	117-118
5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	118-119
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELISA Y WESTERN BLOT	119-121
7. CULTIVOS CELULARES	121-122
8. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS	122-124
9 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS	124-126
10. ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS A TEJIDOS	126-127
11. ENSAYOS DE DETECCIÓN DE NEUTRÓFILOS IN VIVO	127-128
12. ENSAYOS DE MOVILIZACIÓN DE HSPC Y BLOQUEO IN VIVO	128-129
13. ELIMINACIÓN DE CÉLULAS IN VIVO	130
14. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS CXCL12-GFP+	130
15. MICROSCOPIA INTRAVITAL DE MÉDULA ÓSEA EN CALVARIA	131-132
16. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	132
Bibliografía	133-151
Anexos	153-181
Anexo I: Abreviaturas	153-156
Anexo II: Publicaciones	156-181

Resumen



Los neutrófilos son células que se caracterizan por su potencial citotóxico y constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato. Una elevada tasa de producción diaria y su corta vida media, plantean la necesidad de eliminar estas células correctamente y así evitar potenciales efectos adversos en el organismo.

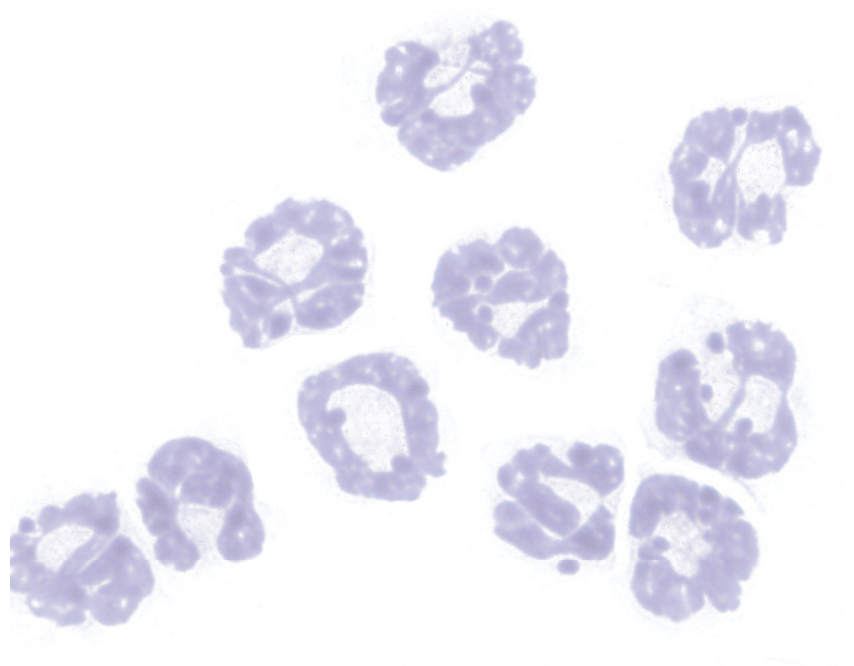
La eliminación de células apoptóticas o en proceso de muerte genera señales necesarias para mantener la homeostasis del organismo. En este trabajo hemos explorado la respuesta fisiológica que se genera como consecuencia de la eliminación de neutrófilos. Nuestros resultados han revelado que la eliminación de neutrófilos en médula ósea es fundamental para la modulación de la actividad del nicho hematopoyético.

Mediante citometría de flujo, hemos identificado una población de neutrófilos que envejecen en circulación y que se discriminan por la expresión de los marcadores $\text{Ly6G}^+\text{CXCR4}^{\text{HI}}\text{CD62L}^{\text{LO}}$. Esta población infiltra la médula ósea y es eliminada diariamente por macrófagos al final del periodo de descanso de los ratones. La eliminación de neutrófilos envejecidos y la activación de señales LXR sincronizada, tiene como consecuencia una reducción en el número de células y en la quimioquina CXCL12 lo cual determina la movilización diaria de progenitores hematopoyéticos a la circulación.

Este trabajo muestra además que la eliminación homeostática de neutrófilos ocurre de manera virtualmente ubicua en el organismo. Hemos observado que la eliminación de neutrófilos circulantes en otros órganos diferentes de la médula ósea, permite la modulación remota del nicho hematopoyético. En concreto, nuestro trabajo sugiere que la eliminación de neutrófilos en piel e intestino regula los niveles de progenitores en sangre. Por tanto, la eliminación en tejidos periféricos de los neutrófilos constituye otro nivel de control en la homeostasis del nicho hematopoyético.

En resumen, nuestros resultados revelan que la eliminación de neutrófilos en condiciones homeostáticas o de inflamación regula la actividad del nicho hematopoyético localmente en médula ósea o mediante señales remotas.

Introducción



HOMEOSTASIS DE NEUTRÓFILOS

1. Sistema inmune e inmunidad innata

Los organismos a lo largo de la evolución han desarrollado barreras físicas o químicas para defenderse del ataque de agentes externos. Junto a estas barreras animales vertebrados e invertebrados han adquirido un segundo nivel de complejidad para la protección del organismo, desarrollando un **sistema inmune** que bien se adapta a antígenos específicos (inmunidad adaptativa) o responde a patrones de organismos extraños de manera innata. El sistema inmune innato se encarga del reconocimiento primario y la defensa contra patógenos. La inmunidad innata y sus mecanismos de acción están muy conservados evolutivamente (1). Sólo los animales vertebrados poseen un tercer nivel de complejidad inmune, el sistema inmune adaptativo (2). En organismos complejos, el sistema inmune innato y adaptativo se comunican entre sí modulando sus respuestas: el sistema innato constituye la primera línea de defensa y su activación es necesaria para el inicio de una respuesta inmune adaptativa.

La inmunidad innata evolucionó para combatir patógenos mediante una respuesta no específica. Por su parte, la inmunidad adaptativa es la responsable de la generación de anticuerpos específicos contra agentes infecciosos o sus productos. La inmunidad adaptativa genera una respuesta que desarrolla memoria inmunológica lo que permite recordar el patógeno ante una segunda infección y así generar una respuesta más efectiva. La respuesta inmune innata requiere de muy poco tiempo (minutos a horas) para responder ante un patógeno, mientras que la adaptativa requiere días (3). En el caso del sistema inmune innato, el reconocimiento del patógeno se realiza a través de receptores PRR (del inglés, *pattern recognition receptors*) (4).

Las células efectoras del sistema inmune innato incluyen células dendríticas, mastocitos y eosinófilos, células natural killer, monocitos, macrófagos y neutrófilos, así como ciertos tipos de linfocitos (5). Los monocitos, los macrófagos y los neutrófilos constituyen la primera barrera contra microorganismos y son esenciales para el control de infecciones ocasionadas por bacterias y otros microorganismos. Los **monocitos** clásicos o inflamatorios (identificados por la expresión elevada del receptor Ly6C, Ly6C^{HI}), son reclutados desde la sangre rápidamente a los sitios donde detectan daño y mediante un programa de diferenciación específico dan origen a macrófagos residentes en tejido. Por su parte, los monocitos patrolling (Ly6C^{LO}) tienen una función defensiva y escanean el endotelio en busca de patógenos o daño vascular (6).

Los **macrófagos** son células fagocíticas que desempeñan importantes funciones durante el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis de tejidos y la resolución de la inflamación. La heterogeneidad de estas células en el organismo responde al alto grado de especialización de las funciones que desempeñan en cada órgano (7, 8). Así, los macrófagos se encargan de la eliminación de células apoptóticas contribuyendo a la reparación del tejido y la recuperación de su homeostasis (9); eliminan núcleos de eritrocitos en médula ósea e hígado (10) y contribuyen al reciclaje de los niveles de hierro en el organismo mediante la fagocitosis de eritrocitos senescentes en la pulpa roja del bazo (11); otras poblaciones como los osteoclastos o macrófagos presentes en hueso permiten la degradación del mismo (12) y los macrófagos presentes en el tejido adiposo, regulan los niveles de insulina y el contenido de lípidos en este tejido (13).

Los **neutrófilos** o leucocitos polimorfonucleares, son la primera línea de defensa del sistema inmune innato y se encargan de la eliminación de patógenos mediante una respuesta que se caracteriza por su rapidez y efectividad. Históricamente el estudio de la función de estas células ha resultado difícil por dos motivos principales: una vida media reducida en circulación (en torno a 6-12 horas en comparación con la de linfocitos, de semanas a años) y por su extrema sensibilidad que dificulta su aislamiento, ya que son fácilmente activados y se alteran sus propiedades in vivo. Sin embargo, en los últimos años la aparición o mejora de nuevos modelos genéticos y de técnicas poco invasivas como la microscopía intravital, han permitido estudiar el comportamiento dinámico de estas células in vivo en un entorno no manipulado (14).

Los neutrófilos constituyen aproximadamente el 10% de leucocitos de la sangre de ratones, mientras que en humanos este número se eleva al 50-70% (15). En respuesta a daño, los neutrófilos migran rápidamente a los focos de inflamación o infección, donde destruyen patógenos mediante diversos mecanismos: la secreción de enzimas proteolíticas contenidas en sus gránulos y la producción de especies reactivas de oxígeno, y a través de la producción de estructuras de DNA denominadas NETs (*neutrophil extracellular traps*) o bien por fagocitosis directa.

La naturaleza destructiva de los neutrófilos demanda un control muy riguroso de los niveles de producción de estas células (o **granulopoesis**) en médula ósea, así como de su distribución en los distintos compartimentos y de su eliminación. El 30% de las células presentes en la médula ósea son neutrófilos y este órgano representa el reservorio principal en el organismo. La **médula ósea** integra señales locales y/o periféricas que determinan la distribución de neutrófilos en el organismo en función de las necesidades de cada momento.

1.1 Homeostasis e inflamación

Los mecanismos que controlan el mantenimiento de la estabilidad interna u **homeostasis**, aseguran que parámetros fundamentales como los niveles de glucosa o la concentración de oxígeno se mantengan dentro de un rango que es aceptable para el organismo. Alteraciones en este equilibrio, resultan en una adaptación transitoria o completa a las nuevas condiciones. En este sentido, es importante entender el sistema inmune como un mediador esencial en la homeostasis del organismo.

La respuesta inflamatoria es un proceso transitorio que intenta restaurar la condición fisiológica previa después de un daño (16). Cuando este mecanismo falla, se desarrollan enfermedades inflamatorias crónicas como por ejemplo la aterosclerosis, la obesidad o el cáncer. Para neutralizar el daño inflamatorio, el sistema inmune innato ha desarrollado un programa de **resolución de la inflamación** que minimiza la amplitud de la respuesta (17). Sin embargo, no todas las respuestas inflamatorias son de la misma magnitud. Existen respuestas inflamatorias basales que son resueltas sin generar variaciones evidentes y por este motivo, los mecanismos que operan en ellas se desconocen. Estas respuestas forman parte de los procesos biológicos normales y no alteran la homeostasis del organismo. Únicamente en condiciones extremas se desencadena una respuesta a estrés, que es lo que conocemos como **inflamación** (18).

La **respuesta inflamatoria** se inicia cuando el parénquima tisular, el endotelio y los macrófagos residentes en tejido detectan la presencia de un patógeno o de daño tisular. Mediante la secreción orquestada de citoquinas y quimioquinas, los neutrófilos son reclutados al tejido diana (19). Una vez en él, los neutrófilos amplifican las señales inflamatorias secretando a su vez más citoquinas que atraen a monocitos. Durante la respuesta inflamatoria los neutrófilos expulsan el contenido tóxico de sus gránulos (enzimas proteolíticas como proteínasa 3, catepsina G, elastasa y especies reactivas de oxígeno o ROS), lo que permite una primera defensa contra los agentes invasores. La acción de estas moléculas es un arma de doble filo, ya que por un lado reducen o eliminan al patógeno, pero por otro generan un ambiente tóxico pudiendo desencadenar un daño en el tejido aún mayor que el iniciado por el patógeno. En condiciones normales una vez terminada su acción en el foco inflamatorio, los neutrófilos mueren por apoptosis y los macrófagos se encargan de eliminarlos en un proceso denominado **eferocitosis** (del latín *efferre*, enterrar). Durante este proceso los neutrófilos promueven su propia eliminación mediante la generación de señales de búsqueda (*find-me*) e ingestión (*eat-me*). Las señales *find me* permiten que los macrófagos encuentren a los

neutrófilos mediante el establecimiento de gradientes de lisofosfatidilcolina (LPC), esfingosina 1-fosfato (SP1), fractalquina (CX3CL1) y los nucleótidos ATP y UTP (9). Por su parte, las señales *eat me* permiten la identificación e inicio de fagocitosis del neutrófilo apoptótico, siendo la fosfatidilserina la señal *eat me* mejor caracterizada. Su localización en la membrana externa de células apoptóticas es reconocida directa o indirectamente -a través de moléculas puente como MFGE8, GAS6 o proteína S- por receptores de macrófagos como TIM4, BA11, estabilina-2 o receptores TAM (Tyro3/Axl/Mer) (20). En paralelo a esta eliminación, los neutrófilos que mueren por apoptosis secretan mediadores que inhiben el reclutamiento de más neutrófilos, contribuyendo así al proceso de **resolución de la inflamación** (17).

La primera observación de la eliminación de neutrófilos por macrófagos fue realizada por Elie Metchnikoff (21), ya entonces apoyando la hipótesis de que la eliminación de neutrófilos o clearance favorece la resolución de la inflamación. Actualmente se acepta que esta eliminación promueve la conversión del fenotipo secretor de macrófagos de inflamatorio a uno anti-inflamatorio, durante el cual se secretan citoquinas como IL-10 y TGF β (22) y lípidos antiinflamatorios que actúan como freno de la respuesta inmune (17). Este mecanismo es un requisito fundamental para la finalización del proceso inflamatorio y la recuperación de la funcionalidad del tejido. Múltiples patologías inflamatorias subyacen a deficiencias en la eliminación de células necróticas (23).

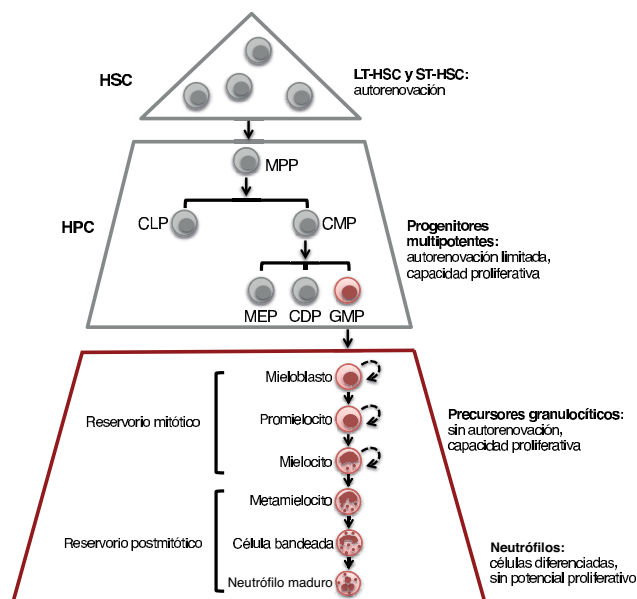
2. Neutrófilos. Granulopoiesis y regulación de la producción de neutrófilos.

Los neutrófilos son los leucocitos mieloides más abundantes, produciéndose de forma constante en médula ósea. En condiciones homeostáticas su diferenciación a partir de precursores mieloides comunes (CMP) tiene una duración aproximada entre 2-3 días y se ha completado antes de abandonar este órgano. Aproximadamente, 10^7 neutrófilos se producen diariamente en ratones a través de sucesivas rondas de diferenciación (Esquema 1). En humanos y tras la diferenciación, los neutrófilos permanecen en médula ósea durante 4-6 días antes de entrar en la circulación sanguínea. Se estima que el 90% de neutrófilos residen en la médula ósea, mientras que sólo el 1-2% se encuentra en el torrente sanguíneo en condiciones basales (24, 25). Mecanismos de control específicos en el tráfico de neutrófilos a sangre, en la distribución de estas células en tejidos y por último, en la tasa de eliminación de los mismos, modulan la producción neta en médula ósea de neutrófilos.

La hematopoiesis y la diferenciación terminal de neutrófilos maduros engloba procesos complejos que están controlados a nivel transcripcional, así como por factores de crecimiento, citoquinas e incluso otros sistemas reguladores, como el sistema nervioso autónomo.

2.1 Granulopoiesis en condiciones basales

El sistema hematopoyético está organizado en una estructura piramidal donde las **células madre hematopoyéticas** (*hematopoietic stem cells*; en adelante HSC) ocupan la posición más alta de la jerarquía (**Esquema 1**). Todas las células del sistema hematopoyético se generan a partir de HSC, las cuales residen en entornos específicos o **nichos hematopoyéticos** en la médula ósea. La frecuencia de HSC es extremadamente reducida y se estima que el 0,001% de las células nucleadas de médula ósea tiene capacidad *stem* o de regeneración del tejido hematopoyético a largo plazo (26). La organización jerárquica del sistema hematopoyético permite la amplificación a gran escala de cualquier



Esquema 1: Diferenciación de HSPC a neutrófilos. El esquema muestra la estructura piramidal de diferenciación de HSC a neutrófilo en médula ósea. En gris aparecen células madre y progenitores indiferenciados (LT-HSC, ST-HSC y MPP), junto a progenitores con potencial comprometido hacia diversos linajes (CLP, CMP, MEP y CDP). En granate, se destacan progenitores mieloides (GMP, *granulocyte-macrophage progenitors*), precursores granulocíticos y neutrófilos maduros. HSC (*hematopoietic stem cells*; ST *short-term* y LT *long-term*), HPC (*hematopoietic progenitor cells*), MPP (*multipotent progenitors*), CLP (*common lymphoid progenitors*), CMP (*common myeloid progenitors*), MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitors*), CDP (*common dendritic progenitors*). Las flechas discontinuas indican capacidad proliferativa.

respuesta controlada por el sistema inmune en el organismo, favoreciendo la diferenciación de un progenitor y/o linaje más adecuado en cada momento.

En homeostasis la mayoría de HSC son quiescentes (27) sin embargo, su activación por estrés puede inducir la movilización o la entrada en ciclo y diferenciación a linajes específicos (28-30). La división de HSC es asimétrica

y resulta en la aparición de una célula HSC hija con capacidad de auto-regeneración y otra que puede diferenciarse en precursores hematopoyéticos multipotentes, cuya potencial de diferenciación es más restringido. Estos progenitores hematopoyéticos (*hematopoietic progenitor cells*, HPC en adelante) carecen de capacidad de auto-regeneración y se diferencian en último término a los distintos linajes hematopoyéticos (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). De ahora en adelante utilizaré el término HSPC para referirme globalmente al conjunto de células madre y progenitores hematopoyéticos (*hematopoietic stem and progenitor cells*).

Las HSPC pueden ser discriminadas de al menos dos maneras, inmuno-fenotípicamente por la ausencia de determinados marcadores de linajes hematopoyéticos diferenciados; o funcionalmente, por su habilidad para reconstituir el sistema hematopoyético de animales letalmente irradiados. La población comúnmente llamada LSK (por presentar un perfil de expresión de marcadores linaje^{NEG}Sca1⁺c-Kit1⁺) identifica por citometría de flujo una población heterogénea con distinta capacidad reconstitutiva que incluye precursores multipotentes MPP (multipotent progenitors); totipotentes pero con autorrenovación limitada (ST-HSC; short-term hematopoietic stem cells), y totipotentes y autorrenovables que son las células madres hematopoyéticas genuinas (LT-HSC; long-term hematopoietic stem cells) (**Esquema 1**). Mediante la expresión de ciertos receptores, como por ejemplo CD48 y CD150 conocidos como marcadores SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecules*), se pueden discriminar estas poblaciones entre sí. Los MPP son por definición multipotentes pero tienen una limitada capacidad de renovación. Este es el caso también de las ST-HSC que reconstituyen sin embargo todos los linajes transitoriamente y se identifican como LSK CD48^{NEG}CD150^{NEG} (**26**). Las células LT-HSC, son las que poseen el potencial ilimitado en ensayos de reconstitución y se discriminan como LSK CD48^{NEG}CD150⁺.

Los progenitores multipotentes o MPP se encuentran en la jerarquía que sigue a las HSC e incluyen progenitores linfoides (CLP), eritroides (MEP) y mieloides (GMP). Los progenitores mieloides originan precursores granulocíticos y monocíticos, mediante el control específico por la familia de factores de transcripción C/EBP. C/EBP- α es fundamental para la aparición de neutrófilos ya que controla la expresión de genes implicados en su diferenciación, como el receptor de G-CSF (**31**). Los GMP originan mieloblastos, promielocitos y mielocitos, todos ellos con capacidad proliferativa y división simétrica, y constituyen el conjunto de precursores mitóticos de neutrófilos. Los mielocitos se diferencian posteriormente en metamielocitos, estos últimos sin capacidad proliferativa. Los metamielocitos originan células bandeadas con-

sideradas células granulocíticas inmaduras y finalmente, son estas las que dan lugar a neutrófilos maduros (32). La aparición de los gránulos citotóxicos característicos de los leucocitos polimorfonucleares se produce en esta etapa. En los promielocitos aparecen los gránulos primarios o azurofílicos, en los mielocitos los gránulos secundarios y finalmente, los gránulos terciarios están presentes desde las células bandeadas hasta la diferenciación terminal de neutrófilos (Esquema 1).

La maduración de neutrófilos en médula ósea tiene una duración de 2,3 días en ratones y está estrictamente controlado por la demanda de neutrófilos y por la disponibilidad de almacenamiento de estas células en el organismo (33). Una vez en circulación, los neutrófilos sufren alteraciones en su fenotipo asociados también a un proceso de maduración, como por ejemplo la adquisición de un núcleo hipersegmentado. El núcleo de los neutrófilos en médula ósea posee una morfología circular y la maduración progresiva de estas células en el torrente sanguíneo induce una transición hacia una morfología multilobulada, con 3-5 lóbulos por núcleo (34).

Existen pues cambios asociados a la maduración y la entrada en circulación de los neutrófilos, pero se conoce muy poco de la naturaleza molecular y la finalidad de estas alteraciones naturales en neutrófilos circulantes.

2.2 Granulopoiesis de emergencia

La infección sistémica provocada por bacterias u otros patógenos induce un programa de diferenciación hematopoyética conocido como **granulopoiesis de emergencia**, con el fin de combatir la infección con neutrófilos generados de novo (35). La granulopoiesis de emergencia se caracteriza por la presencia de neutrofilia en sangre, debida al reclutamiento masivo de células inmaduras bandeadas al torrente sanguíneo. La importancia de este mecanismo se pone de manifiesto en pacientes neutropénicos afectados con infecciones sistémicas los cuales presentan una elevada tasa de mortalidad (35). Por tanto, los mecanismos responsables de la generación de neutrófilos en condiciones homeostáticas o de emergencia, son fundamentales para asegurar la supervivencia del individuo.

La granulopoiesis de emergencia se desarrolla en tres fases. En la primera, el patógeno es reconocido por el sistema inmune y la señal de emergencia es detectada por el nicho hematopoyético. A continuación, este estado se traduce en una serie de eventos moleculares que son necesarios para el aumento de la producción de neutrófilos en la médula ósea. Por último, este programa de

diferenciación tiene que ser silenciado para la recuperación de las condiciones homeostáticas previas que eviten el desarrollo de enfermedades inflamatorias o la extenuación de la médula ósea.

- Reconocimiento del patógeno

El reconocimiento del patógeno que inicia el programa de granulopoiesis de emergencia puede llevarse a cabo de forma directa o indirecta. En el reconocimiento directo, las HSPC detectan la infección a través de receptores TLR (del inglés *Toll-like receptors*, una de las familias de receptores que reconocen patrones moleculares, o PRR). Las HSPC expresan los receptores TLR2 y TLR4 y su activación induce diferenciación a células mieloides efectoras (36).

Las HSPC circulan a través de sangre y linfa por distintos tejidos del organismo (37) y se ha especulado sobre su participación en respuestas inmunes en procesos de inflamación. El reconocimiento directo de microorganismos por HSPC promovería la diferenciación local a células mieloides que participarían en la respuesta inflamatoria. Para apoyar esta hipótesis existen evidencias del reclutamiento de HSPC a tejidos inflamados en modelos de peritonitis, daño hepático o en piel (38-40). En modelos crónicos de aterogénesis y cáncer, se ha detectado la presencia de tráfico de HSPC a bazo donde se induce una diferenciación a monocitos que contribuyen al agravamiento de la enfermedad (41, 42). Igualmente se ha descrito que en animales bajo estrés hay una mayor proliferación y diferenciación de HSPC a monocitos y neutrófilos la cual contribuye, por ejemplo, a la formación de la placa durante la aterosclerosis (29). Finalmente, un estudio reciente ha demostrado que el tratamiento con agonistas de receptores TLR en HSPC puede inducir la secreción de factores pro-hematopoyéticos como IL-6 que regulan la diferenciación mieloide y la proliferación de HSPC (43). Por tanto, el reconocimiento de señales específicas en HSPC permite su diferenciación a células inmunes efectoras. Por otro lado, en el reconocimiento indirecto del patógeno las células de naturaleza endotelial y/o estromal de la médula ósea secretan al plasma citoquinas que promueven la diferenciación de HSPC (44-46), por lo que ambos mecanismos podrían facilitar la aparición de neutrófilos en la respuesta de emergencia.

- Respuesta hematopoyética a la detección del patógeno

Dada la importancia de la granulopoiesis de emergencia para la defensa y supervivencia del organismo, no es sorprendente la existencia de mecanismos redundantes en la regulación del proceso que regula la producción de neutrófilos.

De entre todos los factores, el eje G-CSF/G-CSFR es sin duda el mejor estudiado. G-CSF participa en la proliferación de CMP y GMP y en la movilización de HSPC a la sangre (47, 48). Estudios en ratones deficientes en G-CSF (*Csf3*^{-/-}) (49) o en su receptor (*Csf3r*^{-/-}) (50) han demostrado el papel esencial de esta citoquina en granulopoiesis en condiciones basales. Ratones deficientes en G-CSF o G-CSFR presentan una reducción del 70-90% de neutrófilos en circulación.

Curiosamente el papel de G-CSF en granulopoiesis de emergencia es dependiente del contexto: G-CSF no es una citoquina necesaria para la respuesta de emergencia generada por *Candida albicans* (51), pero sí en infecciones ocasionadas por *Listeria monocytogenes* (49, 52); lo que sugiere por tanto que otras citoquinas podrían intervenir en la regulación de la granulopoiesis en ausencia de G-CSF, como GM-CSF y IL-6 (35). A nivel transcripcional, la diferenciación de HSC a progenitores mieloides en situaciones de emergencia es independiente del factor de transcripción C/EBP- α , pero requiere la expresión del factor de transcripción C/EBP β (53, 54).

- Silenciamiento de la respuesta de emergencia

El sistema hematopoyético requiere también una recuperación de la homeostasis tras un proceso inflamatorio. Diversos estudios han demostrado el papel de las proteínas SOCS y BCL-3 como inhibidores de la ruta de señalización en granulopoiesis de emergencia (55, 56). Por otro lado, C/EBP- α también participa en la progresión del ciclo celular de progenitores mieloides a través de la inhibición de las ciclinas CDK2, CDK4 y MYC, lo que resulta en una estabilización de los niveles de neutrófilos (57, 58). De esta forma, la competición por la unión al promotor de Myc de los factores C/EBP- α y C/EBP- β junto a la normalización de los niveles de G-CSF con la eliminación del patógeno, favorecen la transición de un estado de emergencia a uno de granulopoiesis basal.

Como acabamos de ver la generación de neutrófilos en condiciones basales y en situaciones de emergencia está regulada por mecanismos diferentes. Los eventos moleculares que permiten la transición de una respuesta granulopoiética C/EBP- α dependiente en condiciones basales a una de emergencia C/EBP- β dependiente, no se conocen actualmente en detalle.

La descripción clásica de los neutrófilos como células inflamatorias explica la existencia de numerosos estudios que han abarcado aspectos como su generación, sus funciones y por último, los mecanismos de eliminación de estas células exclusivamente en el contexto inflamatorio. Únicamente en los últimos

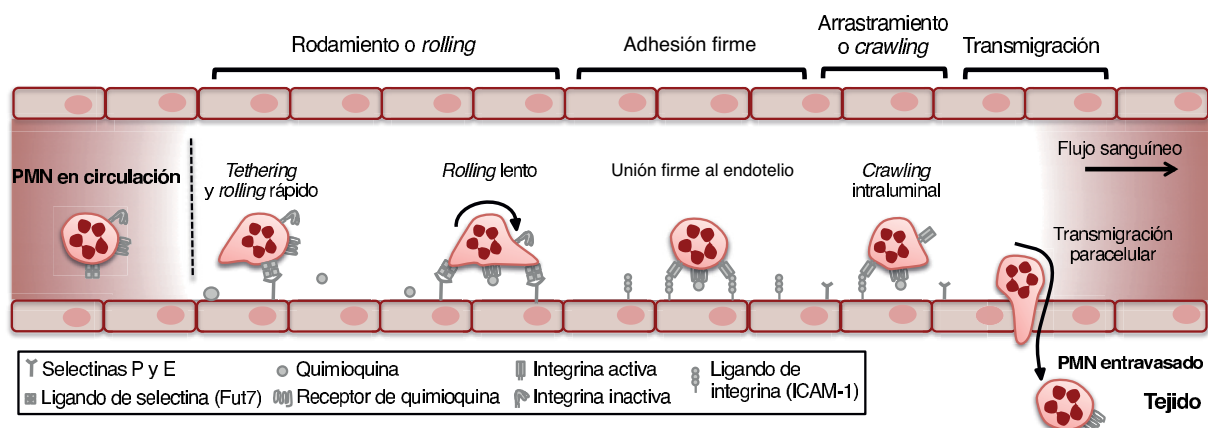
años han surgido estudios que han analizado estos aspectos en homeostasis y por ello, el principal objetivo de esta tesis abordará el estudio de las funciones de neutrófilos en este contexto.

3. Tráfico de neutrófilos.

Los neutrófilos en circulación responden rápidamente a estímulos inflamatorios los cuales facilitan su entrada a los tejidos donde son requeridos. La cascada de migración de leucocitos y de neutrófilos en particular, ha sido extensamente estudiada en las últimas décadas (59). Sin embargo, este proceso ha sido detallado fundamentalmente en el contexto inflamatorio y sólo recientemente se han descrito mecanismos de migración de leucocitos en condiciones homeostáticas (60). Si bien ambos procesos comparten parte de las moléculas implicadas, existen diferencias importantes entre la migración a determinados órganos en condiciones basales e inflamatorias.

3.1 Cascada de reclutamiento de neutrófilos.

En la mayoría de los tejidos la cascada de **reclutamiento de neutrófilos** incluye los siguientes pasos: *tethering* o captura inicial, *rolling* o rodamiento, adhesión firme, *crawling* o arrastre y por último, trans migración a través de la pared del endotelio (Esquema 2).



Esquema 2: Cascada de migración de neutrófilos. En el esquema se muestran las etapas en el reclutamiento de neutrófilos, así como las moléculas implicadas en el endotelio y en el neutrófilo.

El reclutamiento de neutrófilos se inicia por la secreción de mediadores inflamatorios por parte de leucocitos residentes en tejidos, como monocitos, macrófagos y mastocitos, tras la detección de un daño o infección. La detección directa del patógeno o los mediadores inflamatorios (citoquinas, leucotrienos e histaminas) inducen una serie de cambios en la membrana de las células endoteliales que inicia el contacto con leucocitos en sangre (61). El endotelio

activado se caracteriza por un aumento de la expresión de selectinas endoteliales como selectina P (presintetizada y que se almacena en los cuerpos Weibel-Palade) y de selectina E, que se sintetiza *de novo*. Estas dos selectinas tienen funciones complementarias y son fundamentales para el reclutamiento de neutrófilos (62).

Una vez presentes en el endotelio las selectinas endoteliales se unen a ligandos de neutrófilos glicosilados, entre los que se encuentran PSGL-1 (del inglés, *P-selectin glycoprotein ligand-1*), CD44 y ESL-1 (*E-selectin ligand-1*). Las selectinas son lectinas dependientes de la unión a calcio y sus ligandos deben ser funcionales para permitir la unión eficiente entre neutrófilo-endotelio. Este fenómeno se produce mediante la acción de una serie de enzimas que catalizan la glicosilación de ligandos, incluidas sialiltransferasas y **fucosiltransferasas** (63, 64). La unión selectina-ligando es de muy alta afinidad y permite el *tethering* o captura inicial del neutrófilo circulante a la superficie del endotelio, y su posterior *rolling* a lo largo del vaso en la dirección del flujo sanguíneo (65).

El neutrófilo se ayuda en el proceso de *rolling* en condiciones de flujo sanguíneo elevado mediante unas extensiones denominadas *slings* con alto contenido en PSGL-1 y LFA-1, que forman uniones con otros receptores de la misma célula y permiten fortalecer y estabilizar el movimiento sobre el endotelio (66). Posteriormente, la unión de la selectina E a PSGL-1 ó CD44 permite la activación de la integrina LFA-1, la cual gana afinidad por sus ligandos ICAM-1/2 (*intercelular adhesión molecule*) presentes en el endotelio y permite el *slow rolling* de neutrófilos (67). En este punto, las interacciones entre el neutrófilo y el endotelio son lo suficientemente fuertes como para que el neutrófilo pueda escanear la superficie del endotelio en busca de moléculas que lo activen. Quimioquinas inmovilizadas en la superficie de la membrana de las células endoteliales permiten la activación de receptores membrana acoplados a proteínas G en el neutrófilo, lo que induce cambios en la conformación de las integrinas que pasan a mostrar mayor afinidad por sus ligandos (ICAM1/2), en un proceso denominado *inside-out signalling* (68). Estas señales iniciadas por las selectinas permiten la adhesión firme de neutrófilos al endotelio a través de la activación de las integrinas $\beta 2$, LFA-1 y Mac-1.

En este momento el neutrófilo cambia de morfología y se polariza para generar un polo anterior y un polo posterior ó urópodo. La adquisición de este fenotipo es posible por la unión de las integrinas a sus ligandos. Este proceso activa una cascada de señalización en el neutrófilo (*outside-in signalling*) que promueve reordenamientos del citoesqueleto de actina que favorecen el movi-

miento del neutrófilo o *crawling* y durante el cual se escanea la parte luminal del endotelio mediante interacciones entre la integrina Mac-1 e ICAM-1 (**Esquema 2**)(69). Por último, la migración de neutrófilos a través del endotelio permite al neutrófilo abandonar la vasculatura, atravesar el endotelio y posteriormente, la membrana basal. La transmigración requiere de la participación de integrinas e ICAM1/2, además de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) y otras proteínas de unión como PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1* ó CD31), CD99, JAMs (*junctional adhesion molecules*) y ECAM (*epithelial cell adhesion molecule*). La transmigración puede ocurrir vía paracelular –entre 2 células endoteliales- ó por una vía transcelular –a través del cuerpo de una célula endotelial-, aunque al menos en los tejidos estudiados la primera ruta es la más común (70). En este proceso, la disociación de puentes cadherina en la unión intercelular de células endoteliales es necesaria para la entrada del neutrófilo en el espacio intersticial (71). Una vez en la membrana basal, los neutrófilos migran preferencialmente hacia zonas con una menor densidad de proteínas de matriz extracelular, compuesta principalmente de lamininas y colágenos. Estas zonas coinciden con regiones donde existe una separación entre pericitos, que son las células que se localizan en contacto con la membrana basal y rodean a las células endoteliales de capilares y vénulas. Estudios recientes han revelado que en condiciones inflamatorias tanto pericitos como macrófagos secretan quimioquinas en respuesta a DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) y guían a los neutrófilos hacia el foco de la inflamación (19, 72-74).

3.2 Excepciones en la cascada de reclutamiento de neutrófilos

La mayoría de los eventos que se conocen de la cascada de reclutamiento de neutrófilos proceden de experimentos de **microscopía intravital** en músculo esquelético (músculo cremáster) en condiciones inflamatorias (14). Las recientes mejoras en microscopia confocal y multifotón, en la preparación de múltiples tejidos para imagen, así como en la disposición de nuevos modelos de ratones reporteros, ha permitido refinar la cascada de reclutamiento de neutrófilos y caracterizarla en otros tejidos (75). Estos avances han confirmado el reclutamiento de neutrófilos independiente de selectinas e integrinas en determinados órganos como el hígado y el pulmón (76).

El **hígado** es el órgano metabólico central y el reclutamiento de neutrófilos a este órgano presenta particularidades. El hígado tiene un aporte de sangre doble ya que recibe sangre arterial a través de la arteria hepática, dotando al órgano sangre rica en oxígeno. Por otro lado, la vena porta transporta nu-

trientes al hígado procedentes de la vasculatura de bazo e intestinos. Las dos circulaciones convergen en los sinusoides hepáticos, que drenan a través de vénulas postsinusoides. El endotelio sinusoide carece de lámina basal y de uniones estrechas intercelulares y no expresa CD31, CD34 ni cadherina, pero expresa niveles reducidos de VCAM-1 (77) y unos niveles de ICAM-1 superiores a los encontrados en microcirculación sistémica (78). La arquitectura fenestrada de las células endoteliales en los sinusoides y la ausencia de lámina basal permiten el intercambio de fluidos y solutos entre el espacio de Disse (compartimento entre las células endoteliales y los hepatocitos) y el intravascular. Los sinusoides del hígado son vasos de un diámetro reducido (15-30 μm) sólo un poco mayores que el tamaño de un neutrófilo. Por todas estas peculiaridades y por carecer de selectinas endoteliales P y E, el reclutamiento de neutrófilos a los capilares sinusoidales del hígado no requiere del paso previo de *rolling*, sino que los neutrófilos se adhieren directamente al endotelio hepático (79). En un modelo de inflamación estéril se observó que los neutrófilos se adhieren al endotelio a través de interacciones de la integrina MAC-1 con ICAM-1. Sin embargo, en un modelo de infección con *Escherichia coli* el reclutamiento de neutrófilos puede ser integrina-independiente (80). Por tanto, el reclutamiento de neutrófilos en hígado no depende únicamente de la arquitectura del vaso, sino también del estímulo inflamatorio responsable del reclutamiento de neutrófilos.

Otro de los órganos donde la cascada de reclutamiento de neutrófilos no se ajusta al mecanismo descrito anteriormente es el pulmón. El **pulmón** está constantemente expuesto a patógenos externos y requiere un control preciso del sistema inmune para evitar infecciones. En este órgano la microvasculatura está constituida por finos capilares que alteran la forma del neutrófilo para poder atravesar estos conductos y en consecuencia, prolonga su tiempo de tránsito por este tejido. El reclutamiento de neutrófilos ocurre principalmente en los capilares de la red alveolar y no en vénulas postcapilares como ocurre en el resto de la circulación (81). Debido al tamaño de los capilares y al flujo lento de la sangre en el pulmón, se ha sugerido que el reclutamiento a este órgano puede realizarse por un bloqueo mecánico en los capilares más que por mecanismos de migración selectina e integrina-dependiente. De hecho, se ha especulado que parte del **reservorio marginado** de neutrófilos se encuentra en pulmón (82). El receptor CXCR2 en neutrófilos es uno de los más importantes en el reclutamiento de neutrófilos a pulmón (83). Como en el caso del hígado, dependiendo del estímulo inflamatorio, el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón puede ser dependiente o independiente de selectinas e integrinas (76).

En definitiva, aunque los principios generales de la cascada de adhesión pueden resultar válidos para algunos tejidos, en los últimos años se ha demostrado que el reclutamiento de neutrófilos en órganos particulares puede ser distinto al dogma general establecido en la microcirculación muscular. Por ejemplo, la expresión constitutiva de selectinas y ligandos de integrinas que se observa en piel o médula ósea elimina la necesidad de un estímulo inflamatorio para iniciar el reclutamiento en estos tejidos (84, 85). La participación de selectinas e integrinas en el reclutamiento de neutrófilos en cada tejido en condiciones homeostáticas, así como el impacto de la migración de neutrófilos en la fisiología del órgano, son objetivos de esta tesis.

4. Envejecimiento y eliminación de neutrófilos.

La homeostasis de neutrófilos es dependiente del balance entre su generación en la médula ósea, su movilización al torrente sanguíneo, su distribución en tejidos de periferia y finalmente, su eliminación (86). No existe un consenso sobre la vida media exacta para los neutrófilos en humanos ni en roedores (87). Sin embargo, se ha estimado una vida media de 5,4 días en neutrófilos humanos (33) y en torno a 12,5 horas en ratones (33, 88) aunque estos valores pueden alterarse en condiciones inflamatorias y/o de activación (87). Para el cálculo de estos valores se toma como referencia la entrada en circulación de estas células procedentes de la médula ósea. Citoquinas y quimioquinas además de receptores específicos en neutrófilos, regulan el tráfico de estas células de médula ósea a sangre.

La **citoquina G-CSF** (del inglés, *granulocyte colony stimulating factor*) es responsable de la diferenciación de precursores mieloides a neutrófilos y de la movilización de estas células de médula ósea a sangre (24, 48). En consecuencia, la eliminación del gen que codifica G-CSF o de su receptor G-CSFR, resulta en niveles reducidos de neutrófilos en sangre o neutropenia en médula ósea (49, 50). Curiosamente, aunque la estimulación con G-CSF induce movilización de neutrófilos, este no es un efecto directo de la citoquina sobre las células movilizadas sino sobre células estromales del nicho hematopoyético que pierden su capacidad de retenerlas (47, 89).

Existen sin embargo mecanismos directos de movilización mediados por la interacción de receptores de quimioquinas en neutrófilos y sus ligandos: los **ejes CXCR4-CXCL12** (ó SDF1, antes conocida como *stromal cell derived factor 1*) y **CXCR2-CXCL1/2** (90, 91). El balance entre estas dos vías es crítico para mantener los niveles homeostáticos de neutrófilos en sangre.

4.1 Eje CXCR4-CXCL12

CXCL12 es una quimioquina que se produce constitutivamente en médula ósea. Su fuente principal son células estromales entre las que se incluyen células endoteliales, osteoblastos y como principales productoras, las células CAR (CXCL12-*abundant reticular cells*) (92). En condiciones basales la expresión de CXCL12 está modulada por oscilaciones en los ritmos de luz y oscuridad que a través de los nervios simpáticos del sistema nervioso central, transmiten señales adrenérgicas en médula ósea a receptores $\beta 3$ presentes en las células del estroma de este órgano. Esta señal produce la degradación del factor de transcripción SP1 y con ello la disminución de la expresión del transcrito de *Cxcl12* (93). CXCL12 actúa como quimiotrayente de poblaciones de leucocitos y células madre y progenitores hematopoyéticos y es con diferencia la quimioquina más potente en el compartimento inmaduro (94, 95). Su expresión se detecta mayoritariamente en la médula ósea (96), si bien se ha encontrado expresión de CXCL12 en otros tejidos como el pulmón (97).

Los niveles de leucocitos en sangre oscilan en antifase a los niveles de CXCL12 en médula ósea, siendo el número de leucocitos máximo 5 horas después del encendido de la luz (ZT5¹) y alcanzando niveles basales 8-12 horas después (ZT13-17) (93). En contraposición, el número de leucocitos que se adhieren al endotelio de médula ósea es inversamente proporcional al encontrado en sangre y la adhesión es superior a ZT13 que a ZT5. Este fenómeno se correlaciona con una mayor expresión en la vasculatura medular de los receptores requeridos para el tráfico a este órgano: selectinas P y E, y VCAM-1 (60).

CXCR4 es un receptor de membrana con 7 dominios transmembrana acoplado a proteína G que se expresa en casi todos los tipos leucocitarios (98-100) y señala exclusivamente en respuesta a CXCL12 (90). Existen numerosas evidencias que apoyan el papel de este receptor en la retención de neutrófilos en médula: la administración del antagonista farmacológico de CXCR4 (AMD3100) induce un aumento del número de neutrófilos (y otras poblaciones hematopoyéticas) en circulación que correlaciona con una disminución del número de estos en médula ósea (24). Por otro lado, animales deficientes para la expresión de CXCR4 en células mieloides presentan neutrofilia en sangre y neutropenia en médula ósea, sin cambios significativos en los niveles de progenitores mieloides en médula ósea (101). Estas evidencias demuestran el papel de la interacción de CXCR4 con CXCL12 en la retención de neutrófilos en médula ósea.

¹ ZT corresponde al término alemán zeitgeber time. Ver sección 1.2.2. Regulación circadiana del sistema hematopoyético y del sistema inmune.

4.2 Eje CXCR2-CXCL1

Para abandonar la médula ósea los neutrófilos necesitan atravesar el endotelio que los separa de la circulación. Para ello una serie de ligandos y sus receptores coordinan un flujo constante de movilización de estas células. Las quimioquinas **CXCL1** y **CXCL2** se unen al receptor **CXCR2** y se han relacionado clásicamente con el reclutamiento de neutrófilos de sangre al foco de inflamación (83). CXCL1 y CXCL2 se expresan constitutivamente en osteoblastos y células endoteliales (91) y la administración exógena de estas citoquinas induce movilización de neutrófilos procedentes de médula ósea (102). En animales transplantados con una mezcla de médula ósea procedente de donantes WT y *Cxcr2*^{-/-} el número de neutrófilos *Cxcr2*^{-/-} en sangre está reducido en condiciones basales y tras la movilización farmacológica con G-CSF, mientras que el número de neutrófilos en médula ósea *Cxcr2*^{-/-} aparece aumentado, sugiriendo una retención de estas células por la ausencia de este receptor (91). Por otra parte la administración de CXCL1 y el bloqueo selectivo de CXCR4 con anticuerpos específicos, moviliza neutrófilos procedentes de médula ósea (103). Adicionalmente, en un elegante estudio de Gunzer y colaboradores se demostró que la movilización de neutrófilos inducida por G-CSF se produce como consecuencia de un aumento de los niveles de trombopoietina en médula ósea, que ocasiona la liberación de las quimioquinas CXCL1 y CXCL2 sintetizados por megacariocitos (104). Estas evidencias sugieren un papel para CXCR2 en la movilización de neutrófilos a sangre.

Dada la demostrada participación de neutrófilos en daño vascular durante procesos inflamatorios se cree que la renovación del repertorio de neutrófilos circulantes es fundamental para preservar la integridad del sistema vascular (105). El organismo se enfrenta al reto no sólo de generar nuevos neutrófilos y movilizarlos a circulación, sino también de permitir su eliminación ordenada.

4.3 Eliminación de neutrófilos

La enorme producción de neutrófilos que tiene lugar diariamente en el organismo permite un sistema de defensa altamente rápido y efectivo. Sin embargo, en condiciones no inflamatorias la eliminación de neutrófilos es un mecanismo necesario para frenar daños potenciales promovidos por su activación y la expulsión de su arsenal citotóxico. Clásicamente la eliminación de neutrófilos se ha descrito en médula ósea, hígado y bazo (106, 107). No

obstante las consecuencias fisiológicas de la eliminación fisiológica o **clearance de neutrófilos** en estos órganos, no han sido estudiadas en detalle.

Se ha propuesto que los neutrófilos en circulación envejecen y su respuesta como células del sistema inmune se ve comprometida, haciendo necesaria su eliminación **(108)**. Experimentos *ex vivo* con neutrófilos humanos han demostrado que una de las características que define el envejecimiento de neutrófilos es el aumento en los niveles de CXCR4 en la superficie celular **(90, 109)**. La adquisición de este fenotipo dotaría a los neutrófilos de un mayor tropismo hacia la médula ósea donde los niveles de CXCL12 son elevados. Este tropismo estaría además favorecido por una disminución de la migración de neutrófilos dependiente de CXCR2, ya que CXCL12 suprime la quimiotaxis de neutrófilos mediada por este receptor **(90)**. Los cambios en la expresión del receptor CXCR4 están coordinados con el aumento de expresión de receptores relacionados con apoptosis (anexina V y CD16). Los receptores CXCR2 y CXCR4 desempeñan por tanto funciones antagónicas en neutrófilos: movilización y retención en médula, respectivamente **(91)**.

Experimentos con neutrófilos envejecidos *ex vivo* demostraron por primera vez el papel de la médula ósea como órgano de eliminación de neutrófilos **(110)**, aunque estudios previos habían sugerido esta posibilidad para neutrófilos humanos marcados con radioisótopos **(111-113)**. La fagocitosis de neutrófilos apoptóticos se ha relacionado con la conversión del perfil secretor de macrófagos hacia un perfil antiinflamatorio, al menos *in vitro* **(22)**. En el caso particular de macrófagos derivados de médula ósea, la eliminación de neutrófilos se ha relacionado con una mayor secreción de G-CSF **(110)** lo que podría regular *in vivo* la movilización y producción de una nueva ola de granulocitos. Se ignora sin embargo si esta serie de procesos ocurren *in vivo*.

Además es importante resaltar que la eliminación de neutrófilos no se produce de forma exclusiva en médula ósea. Surat y colaboradores **(106)** demostraron que otros órganos que participan en la eliminación de neutrófilos son el hígado y el bazo y que el órgano de eliminación, depende sustancialmente del grado de maduración y de activación de neutrófilos, especialmente tras un estímulo inflamatorio. Todos estos estudios han empleado sistemas en mayor o menor medida artificiales, como la purificación *ex vivo* y la transferencia de neutrófilos, que en el caso de unas células tan sensibles pueden comprometer la interpretación de los resultados.

En esta tesis abordamos globalmente el proceso de eliminación homeostático de neutrófilos y analizamos el impacto de esta eliminación en determinados procesos fisiológicos del organismo.

REGULACIÓN DEL NICHOS HEMATOPOYÉTICO

El **nicho hematopoyético** es el microambiente que mantiene y regula la proliferación y diferenciación de las células madre de la sangre. Las células que constituyen este microambiente bien por contacto directo o por factores secretados al entorno, pueden modificar el comportamiento de las células madre y progenitores hematopoyéticos en la médula ósea. Las señales procedentes de estas células son fundamentales para el mantenimiento de una reserva constante de HSC en médula ósea, modulando la diferenciación o proliferación de HSPC, así como su permanencia en médula ósea o su movilización a otros órganos.

En homeostasis la mayoría de HSC permanecen en estado quiescente aunque alteraciones en el entorno del nicho hematopoyético (por ejemplo, anemia o estrés inducido por factores citotóxicos) favorecen la proliferación de HSC y su diferenciación (28, 30). De la misma forma, la eliminación genética de ciertos factores en las células que constituyen el nicho o la ablación de las células que las producen, puede ocasionar disfunción en el compartimento hematopoyético, con el consiguiente desarrollo de enfermedades (114-117).

1. El nicho hematopoyético en médula ósea.

El concepto de nicho hematopoyético fue propuesto en 1978 por Ray Schofield, quien postuló la existencia de un entorno especializado o nicho donde las células madre hematopoyéticas conservarían la capacidad para reconstituir el linaje hematopoyético en animales letalmente irradiados (118). Anteriormente Till y McCulloch habían desarrollado el ensayo de unidades formadoras de colonias o CFU (del inglés, *colony forming units*) permitiendo la cuantificación de progenitores multipotentes *in vitro* y su discriminación de HSC con capacidad de auto-regeneración y mantenimiento a largo término. Independientemente, Dexter y colaboradores habían demostrado la importancia del estroma en el mantenimiento de células madre hematopoyéticas *ex vivo* (119). Estudios adicionales confirmaron la hipótesis de la interacción entre el estroma y las células residentes en la cavidad ósea y HSC (120, 121).

La validación del concepto de nicho *in vivo* llegó de la mano de los laboratorios de David Scadden y Linheng Li, quienes en 2003 demostraron que la activación de osteoblastos promueve la expansión *in vivo* del reservorio de HSC en la médula ósea utilizando modelos genéticos murinos (122, 123). Estos estudios demostraron por primera vez la interacción funcional entre células

de distintos linajes en el nicho hematopoyético (osteoblastos y HSC) y revelaron la posibilidad de alterar experimentalmente componentes del microambiente hematopoyético. Desde entonces, numerosos estudios han refinado nuestra comprensión del entorno donde residen células madre y progenitores hematopoyéticos (124).

Se ha estudiado exhaustivamente qué elementos o estructuras de la médula ósea mantienen la localización y la quiescencia de las HSC en el nicho hematopoyético, con el fin de definir los mediadores de la localización específica de HSC en médula ósea. Estos estudios han demostrado que las células mesenquimales² que originan el hueso y las que se sitúan en zonas perivasculares son importantes en la regulación del nicho hematopoyético de la médula ósea (125). Estudios muy recientes han demostrado además que las HSC más quiescentes se localizan asociadas a arteriolas del endosteo (tejido conectivo en contacto con el hueso que reviste la médula) mientras que las HSC que proliferan y se diferencian se encuentran asociadas a vasos sinusoidales (126).

1.1 Composición del nicho hematopoyético

- CXCL12

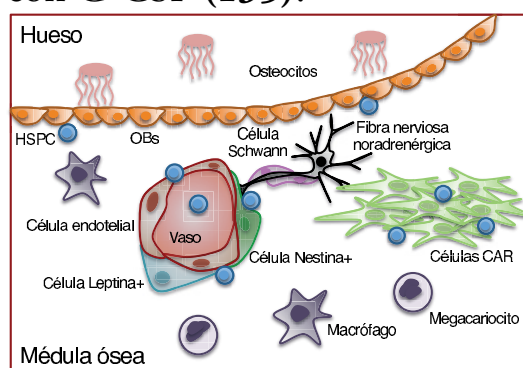
La importancia de CXCL12 en el nicho hematopoyético fue introducida por primera vez en estudios en animales deficientes para este gen. Los ratones *Cxcl12*^{-/-} mueren en torno al día 18,5 del desarrollo embrionario y la médula ósea de estos animales es hipocelular y presenta un número reducido de progenitores mieloides y linfoides (127). Sin embargo, la eliminación condicional de *Cxcl12* en los distintos subtipos de células mesenquimales que se encuentran en médula ósea, tiene un impacto distinto sobre el nicho hematopoyético en función de la célula afectada: en células que expresan el receptor de leptina (leptinaR+) disminuye el número de HSC y las moviliza a circulación (128), mientras que en células endoteliales el número de HSC disminuye aunque no se movilizan a sangre (128, 129). Por último, la eliminación de este gen en osteoblastos y sus progenitores, en células hematopoyéticas y en células Nestina+ no afecta a la frecuencia de HSC ni a la retención de estas células en médula ósea (129, 130).

En la [Tabla 1](#) y el [Esquema 3](#) se recogen los componentes fundamentales descritos hasta el momento en la caracterización del nicho hematopoyético en médula ósea.

² El término células mesenquimales o estroma se utiliza como sinónimo para definir un conjunto heterogéneo de poblaciones no hematopoyéticas con potencial de diferenciación en otros linajes (en el caso de MSCs) o no (células diferenciadas en el caso de osteoblastos, células CAR y células leptinaR+).

- Osteoblastos y osteocitos

La médula ósea recoge un conjunto de células procedentes del linaje osteoblástico, entre las que se encuentran células madre mesenquimales, osteoprogenitores, osteoblastos maduros y finalmente, osteocitos maduros embebidos en la matriz del hueso. Estudios iniciales apuntaron a un papel regulador de los osteoblastos en el mantenimiento de los niveles de HSC en médula ósea (122, 123). Sin embargo, estudios más recientes han cuestionado el papel de osteoblastos en la regulación de HSC. La eliminación condicional de factores que regulan células madre hematopoyéticas -como CXCL12 ó SCF (*stem cell factor*)- en osteoblastos maduros no afecta la celularidad ni la composición del nicho hematopoyético de médula ósea ni tampoco la habilidad de las HSC para reconstituir animales letalmente irradiados, lo que excluye una regulación directa de osteoblastos sobre HSC (129-131). Es posible sin embargo una relación indirecta basada en estudios que apoyan que la presencia de osteoblastos promueve la formación de vasos sanguíneos y la aparición de HSC en ellos (132, 133). También se ha especulado con la idea de que los osteoblastos podrían secretar citoquinas y proteínas a la matriz extracelular capaces de modular directamente HSC o que su actividad podría afectar la región endosteal, donde abundan las HSC (125). En general, la variabilidad entre los modelos utilizados para estudiar células del linaje osteoblástico ha limitado las conclusiones acerca de la contribución de estas células en la regulación directa o indirecta de HSC en el nicho hematopoyético (134). Por otra parte, se ha demostrado la contribución de osteocitos en la retención de HSC en el nicho hematopoyético en un modelo de movilización inducida con G-CSF (135).



Esquema 3 Componentes del nicho hematopoyético de médula ósea.

Componente celular	Efecto en nicho
Osteocitos	¿Efectos indirectos? Retención y mantenimiento de HSC en M.O
Osteoblastos	Reguladores del nicho de progenitores linfoides
Macrófagos	Reguladores de la función de MSC y osteoblastos
Megacariocitos	Mantenimiento de la quiescencia de HSC
Adipocitos	Reguladores negativos de la hematopoiesis
Células endoteliales	Retención de HSC en M.O y proliferación
Células Nestina+	Mantenimiento y retención de HSC en M.O. Fuente de factores solubles y no solubles de HSPC. Precursores de OBs, adipocitos y condrocitos.
Células CAR	
Células Schwann	Mantenimiento de la quiescencia de HSC
Células Leptina+	Retención de HSC en M.O
Sistema nervioso noradrenérgico	Retención HSC en M.O

Tabla 1: Contribución a la actividad del nicho hematopoyético de los distintos tipos celulares que lo conforman.

- Células mesenquimales perivasculares

Dada la localización de HSC próximas a los vasos sanguíneos se han analizado las poblaciones de células estromales que rodean a estos vasos con el fin de entender su contribución al nicho hematopoyético.

El estroma mesenquimal es altamente heterogéneo y se han identificado 4 poblaciones principales en médula ósea: células madre y progenitores mesenquimales, células positivas para el receptor de leptina (Leptina R+), células CAR (CXCL12-abundant reticular cells) y células endoteliales. Todas estas poblaciones expresan factores que promueven el mantenimiento de HSC en estado quiescente o su permanencia en médula ósea (**136, 137**).

Las células madre mesenquimales (MSC) son capaces de generar osteoblastos, adipocitos y condrocitos y se han relacionado directamente con la regulación de HSPC en la médula ósea (**138, 139**). Dentro del conjunto de células MSC, la expresión del filamento intermedio nestina identifica una población de células con expresión elevada de genes relacionados con la actividad del nicho (*Cxcl12* y *Scf*). Las células Nestina+ se localizan próximas a HSC alrededor de vasos sanguíneos que irrigan la médula ósea. La eliminación experimental de células Nestina+ causa la pérdida de HSC del compartimento medular, sugiriendo un papel fundamental para estas células en la regulación del nicho hematopoyético (**138**).

Las células mesenquimales LeptinaR+ expresan altos niveles de SCF y CXCL12 (**128, 130**). Se encuentran en una localización perivascular y co-localizan con células estromales identificadas con el marcador nestina (126, 140), contribuyendo a la regeneración de adipocitos y hueso (**141**). La eliminación del gen que codifica para CXCL12 de las células LeptinaR+ tiene efectos directos en el número y retención de HSC en médula ósea (**130**), sugiriendo un papel primordial de nicho para estas MSC.

Otra población perivascular que expresan los niveles muy elevados de CXCL12 son las células CAR. Esta población que incluye todas las poblaciones productoras de CXCL12, regula la proliferación y el tráfico de HSC de médula ósea a sangre (**128, 142**).

- Células endoteliales

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la médula ósea promueven el mantenimiento de HSC (**26**) y regeneración después de daño (**143**). Se encuentran rodeadas de pericitos, células Nestina+ y células LeptinaR+. Estudios recientes han confirmado que la expresión de la selectina E en células endoteliales es un importante inductor de la proliferación de HSC en médula ósea (**144**). Así mismo, las células endoteliales contribuyen a la proliferación y retención de HSC en médula ósea mediante la secreción de factores paracrinós (**145, 146**). Estudios sistemáticos comparando las distintas poblaciones estromales han encontrado que la eliminación condicional de SCF en célu-

las endoteliales promueve la pérdida de HSC del compartimento medular, sin embargo su eliminación de otros componentes del nicho hematopoyético como células de origen osteoblástico, células Nestina+ o las propias células hematopoyéticas, no afecta la frecuencia de HSC en médula ósea **(130)**.

En conjunto, estas evidencias ponen de manifiesto que las HSC residen en un nicho perivascular en el cual las células estromales y las células endoteliales aportan factores tróficos fundamentales para las HSC.

- Inervación simpática y células Schwann

El sistema nervioso simpático regula el tráfico de HSPC a sangre en condiciones homeostáticas, a través de la producción de señales adrenérgicas que modulan la respuesta de la médula ósea. El contacto entre los nervios noradrenérgicos y los receptores $\beta 3$ de las células Nestina+ promueve la disminución en los niveles de expresión de genes implicados en el mantenimiento de HSC en médula ósea incluyendo *Cxcl12*, *Angpt1* (angiopoietina 1), *stem cell factor* (Kitl) y *Vcam1*. Esta disminución promueve la movilización natural o inducida de HSC de la médula ósea **(138, 147)**. Por otra parte, estudios recientes han implicado a ciertas células gliales -células de Schwann que se encuentran asociadas a los nervios simpáticos- en la regulación del estado quiescente de las HSC, a través de la activación de la ruta de señalización de TGF β -SMAD **(148)**.

- Macrófagos

Los macrófagos de médula ósea han sido identificados como componentes del nicho hematopoyético por su capacidad de regular la actividad de células Nestina+ y la producción de CXCL12. Macrófagos que expresan la sialoadhesina CD169 promueven la retención de HSPC en médula ósea y la quiescencia de HSC en situaciones de estrés **(149-151)**.

- Adipocitos

Mientras muchas de las células asociadas al nicho hematopoyético se han caracterizado por regular positivamente a éste, los adipocitos han sido identificados como reguladores negativos de su actividad. Las cavidades de la médula ósea con un mayor contenido en tejido adiposo contienen menos HSPC y la inhibición de la adipogénesis induce una reconstitución acelerada en modelos de mieloablación y trasplante de médula ósea **(152)**. Recientemente un estudio ha descrito el papel del factor de transcripción FOXC1 en células CAR en la inhibición de su diferenciación a adipocitos **(153)**. Ratones deficientes

para este factor de transcripción presentan un número reducido de HSPC que correlaciona con un aumento en el número de adipocitos en las cavidades de la médula ósea y compromete la función del nicho hematopoyético.

- Megacariocitos

Recientemente se ha demostrado el papel regulador de los megacariocitos en el nicho hematopoyético. Estas células desempeñan una función crítica en la recuperación e implante (la ubicación productiva de HSC en nichos hematopoyéticos) de HSC tras mieloablación **(154)**. Curiosamente, estudios recientes han confirmado in vivo el papel indirecto de megacariocitos como células reguladoras de la quiescencia de HSC mediante la secreción de citoquinas como CXCL4 y TGF β **(155, 156)**.

1.2 Mecanismos de regulación del nicho hematopoyético de médula ósea

Un aspecto asociado al estudio del nicho hematopoyético es la capacidad de las HSPC de migrar hacia y fuera de este compartimento. La migración de HSPC es fundamental durante el desarrollo embrionario para la ocupación de otros órganos hematopoyéticos y para el mantenimiento de la homeostasis de la propia médula ósea, consiguiendo así un equilibrio entre el número de HSPC que proliferan y se diferencian, y aquellas que abandonan la médula ósea **(37, 157, 158)**.

1.2.1 Tráfico de células madre y progenitores hematopoyéticos.

Al igual que en neutrófilos, el eje CXCL12-CXCR4 representa una señal fundamental para el tráfico de HSPC de médula a sangre o de sangre a médula ósea. CXCL12 actúa a través de su receptor CXCR4 y genera señales quimiotácticas atrayentes para HSPC en médula ósea **(37)**. Las mismas señales inducen la adhesión de progenitores **(159-162)** y la quiescencia y renovación de HSC en médula ósea **(142, 163)**. La eliminación del gen que codifica su receptor *Cxcr4* disminuye el número de HSC **(142)**. CXCR4 es esencial para el anidamiento o homing y el implante de las HSC transplantadas **(95)**. Por otro lado, G-CSF promueve la movilización de HSPC a la circulación provocando la disminución en los niveles de CXCL12 a nivel de proteína y transcrito en la médula ósea **(164)**. Se ha demostrado que tanto CXCL12 como CXCR4 son fragmentados tras la estimulación con G-CSF, lo que bloquea doblemente este eje de retención **(47)** y facilita la salida a sangre de HSPC. El papel de CXCR4 en la migración de HSPC a médula ósea ha sido además

validado usando toxina pertúsica (PTx), cuya acción bloquea la transducción de señales a través de receptores acoplados a proteínas G como es el caso de CXCR4. La PTx disminuye la capacidad de HSPC de responder a CXCL12 y reduce el implante de estas células en sus respectivos nichos (165).

Las HSPC también residen fuera de la médula ósea en condiciones basales (37, 93). Aunque se desconocen las propiedades o funciones específicas de las HSPC fuera de médula ósea, se ha propuesto que podrían participar en procesos de inflamación mediante su diferenciación a células efectoras (36). Curiosamente, las HSPC en circulación modulan la expresión de la molécula CD47 que las protege de la fagocitosis cuando re-entran en tejidos (166). En tejidos periféricos, las HSPC se han encontrado en el hígado (167), el bazo (26, 42), el tejido adiposo (168), el músculo (169), en la linfa, el pulmón y el riñón (158). Las HSPC en estos órganos no son estáticas y migran a través de distintos tejidos durante 36 horas aproximadamente, después de lo cual retornan a través de la linfa y la sangre a la médula ósea (37, 158). Existe por tanto un tráfico continuo de HSPC entre la médula ósea, los sistemas circulatorios (sangre y linfa) y órganos en periferia (es decir, extramedulares).

Es importante destacar que en la actualidad ningún estudio ha permitido discriminar si la presencia de HSPC en tejidos como los anteriores es un reflejo de la permanencia de estas células en órgano y de la existencia de un nicho hematopoyético en estos tejidos, o si contrariamente refleja un tránsito puntual de HSPC a través de estos órganos. En la mayoría de estos tejidos las HSPC se encuentran asociadas con estructuras vasculares que se asemejan a las descritas en los nichos hematopoyéticos en médula ósea (26), si bien la descripción de un nicho hematopoyético como tal en estos órganos no se ha considerado hasta el momento (125).

1.2.2 Regulación circadiana del nicho hematopoyético y del sistema inmune

El sistema hematopoyético como otros del organismo, se encuentra bajo regulación circadiana. El término **ritmo circadiano** hace referencia a las oscilaciones endógenas de los organismos asociadas con la rotación diaria de la tierra en torno al sol (170). La aparición de los ritmos circadianos en organismos aeróbicos responde a una adaptación para anticipar cambios en el entorno relacionados con los niveles de oxígeno (171). Los ritmos circadianos suponen por tanto una ventaja adaptativa en los organismos para obtener energía eficientemente en ambientes no estáticos. En mamíferos, se estima que en torno al 10% del genoma se encuentra bajo control circadiano (172, 173).

Los ritmos circadianos presentan una duración aproximada de 24 horas pudiendo ser ajustados frente a la exposición a distintos ambientes como variaciones geofísicas, de temperatura, u otras (174). Para que un ritmo sea circadiano debe oscilar en un ambiente constante, independientemente de factores externos como la luz o la comida. El término **Zeitgeber** (del alemán, estímulo o dador de tiempo) hace referencia a los estímulos del entorno que un organismo recibe (luz, comida o temperatura) y que permiten la sincronización del reloj interno del organismo con los ciclos rotacionales de 24 horas del globo terrestre (174). La luz representa el estímulo principal o zeitgeber para alinear los ritmos internos del organismo con los del ambiente que le rodea.

- Regulación molecular del reloj circadiano

El reloj molecular circadiano consiste en una red compleja de factores de transcripción que cooperan integrados en un bucle autoregurable y que comprende regulación a nivel transcripcional y traduccional. Los factores de transcripción BMAL1 (del inglés, *brain and muscle ARNT-like 1*), CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) y ROR α (*retinoic acid receptor-related orphan receptor*) funcionan como activadores transcripcionales de esta maquinaria, mientras que PER (*period circadian protein*), CRY (*cryptochrome*) y REV-ERB, actúan como inhibidores de la actividad de BMAL1 y CLOCK (175).

Los componentes del reloj molecular circadiano desempeñan un papel fundamental en la regulación y actividad del sistema inmune (176). El reloj molecular controla la expresión de citoquinas y receptores de patógenos en las células del sistema inmune innato (177-180), así como la diferenciación de células Th17 (181). Recientemente se ha demostrado la existencia de un reloj molecular en el epitelio pulmonar que controla la magnitud de la inflamación mediada por neutrófilos y la respuesta a patógenos en este órgano (177). Distintos estudios confirman por tanto que la respuesta inmune innata y adaptativa se encuentran reguladas por control circadiano y que este tipo de regulación podría extenderse a múltiples células en el organismo, sincronizando las respuestas fisiológicas en el individuo.

- Ritmos en el sistema hematopoyético

El sistema nervioso simpático es un importante regulador de los ritmos circadianos. Los niveles del neurotransmisor noradrenalina presentan elevaciones al comienzo de la fase de actividad en ratones y este neurotransmisor se libera localmente en médula ósea (182). Por otra parte, existen evidencias

que demuestran la existencia de una tasa de proliferación dependiente de modulación circadiana en HSPC y en leucocitos maduros en médula ósea **(183)**. Además, existe una interacción funcional entre los nervios noradrenérgicos y los receptores $\beta 3$ de las células Nestina+ que promueve la disminución de la expresión de genes implicados en el mantenimiento de HSC como *Cxcl12* **(138)**. Por tanto, el SNS integra señales tipo zeitgeber y de esta forma regula la respuesta del nicho hematopoyético.

La regulación circadiana en el nicho hematopoyético se puso de manifiesto por primera vez con la observación de que los niveles de HSPC en sangre fluctuaban regidos por oscilaciones rítmicas en los niveles de CXCL12 en médula ósea **(93)**. Las HSPC se movilizan al torrente sanguíneo al comienzo de la fase de descanso y exhiben sus niveles máximos en ratones a ZT5, con niveles mínimos por la noche (a partir de ZT13). Este fenómeno parece estar regulado por CXCL12, cuyos niveles son máximos a ZT21 y mínimos a ZT9. Las células responsables de la producción de esta quimioquina son células estromales perivasculares **(124)**. En el caso de las células Nestina+ se ha demostrado que reciben innervación directa por nervios adrenérgicos del SNS. La señalización adrenérgica rítmica promueve la degradación del factor de transcripción SP1 y la disminución de los niveles en la médula ósea de CXCL12 **(93)**.

CXCL12 y su receptor CXCR4 se encuentran regulados por el conjunto de genes del reloj molecular circadiano. Animales deficientes para el gen que codifica BMAL1 (*Arntl*) no presentan oscilaciones en los niveles de CXCR4 en células LSK ni en los niveles de progenitores hematopoyéticos en sangre, ni en *Cxcl12* en médula ósea **(93, 184)**. Se ha comprobado que genes circadianos como *Per2* y *Rev-erba* presentan perfiles de expresión circadianos en HSPC, aunque solo *Per2* oscila en las células más primitivas **(185)**. Las fluctuaciones circadianas en los niveles de HSPC en circulación se mantienen durante la movilización con G-CSF ó AMD3100, indicando que la regulación circadiana del nicho hematopoyético es clave en condiciones homeostáticas y de estrés **(184, 186)**.

- Ritmos en el sistema inmune

En las últimas décadas numerosos estudios han demostrado que el sistema inmune se encuentra igualmente regulado por el control circadiano **(187)**. Ejemplos de esta regulación los encontramos en el número de las células del sistema inmune en circulación, así como en los niveles de citoquinas y quimioquinas en plasma relacionadas con su actividad o reclutamiento. La mo-

dulación circadiana del sistema inmune varía en relación de si las especies son diurnas -como los humanos- o nocturnas -como roedores- (**187, 188**). Tal es el caso de los niveles de leucocitos en sangre que tienen sus niveles más altos durante el día en ratones pero estos niveles se dan en humanos por la noche, ambos coincidentes con la fase de descanso en ambas especies. En contraposición, los eritrocitos y las plaquetas no presentan fluctuaciones en sus niveles en sangre.

Es interesante destacar que el reclutamiento de leucocitos a tejidos en concreto a médula ósea y músculo esquelético, ocurre preferentemente al comienzo de la fase de actividad en modelos murinos (**60**). Este fenómeno se explica por una modulación temporal en los niveles de quimioquinas que favorecen el reclutamiento de leucocitos, en paralelo con las moléculas de adhesión que se expresan en las células endoteliales. Además, el reclutamiento de leucocitos parece estar regulado específicamente en cada tejido: por ejemplo, en la médula ósea la expresión de las selectinas P y E, VCAM-1 y la quimioquina CXCL12 es rítmica con una expresión mayor a ZT13, sin embargo en tejidos como el músculo esquelético, las oscilaciones en la expresión afectan a ICAM-1 y *Ccl2* (**60, 93**). Estos datos sugieren la existencia de una regulación circadiana en la migración de leucocitos específica de tejido, como se ha demostrado en corazón, hígado y bazo (**172-174**).

Existen además evidencias de una regulación en leucocitos de moléculas relacionadas con migración y reguladas por el reloj molecular. Así, en monocitos inflamatorios la expresión del receptor CCR2 está regulada intrínsecamente por BMAL1 y controla la ritmicidad de los niveles y actividad de estos leucocitos (**179**). Es importante destacar que en este estudio la disrupción de los ritmos de monocitos Ly6C^{HI} resultó en un aumento en la severidad de la respuesta ante infecciones y en la sensibilidad a desarrollar enfermedad metabólica.

En conjunto la jerarquía de células del sistema hematopoyético desde HSPC hasta leucocitos maduros exhiben oscilaciones circadianas en sangre y presuntamente, en tejidos (**187**), lo que sugiere que la regulación circadiana del sistema inmune y del hematopoyético podría tener un impacto en la progresión de determinadas enfermedades.

2. Regulación remota del nicho hematopoyético de médula ósea y nichos en periferia: fagocitos y metabolismo lipídico.

Existen evidencias que demuestran que la eliminación de neutrófilos en tejidos distintos a la médula ósea puede contribuir a la regulación del nicho hematopoyético de manera remota y en concreto, a la regulación de la granulopoiesis **(189)**. En estos estudios se demostró que debido a la eliminación defectuosa de neutrófilos en ratones deficientes en moléculas de adhesión estos animales desarrollaban neutrofilia en sangre. El defecto en tráfico de neutrófilos a órganos como el pulmón, el bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos se correlacionó con una disminución en la fagocitosis de estas células por macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, sólo existen evidencias *in vitro* de que la fagocitosis de neutrófilos inhibe la producción de IL-23, una citoquina que induce la producción de IL-17 en células T, lo que a su vez favorece la producción de G-CSF en médula ósea **(189)**. Los autores de este trabajo especularon que el aumento anormal de G-CSF por este mecanismo favorecería una nueva ola de diferenciación y producción de neutrófilos, contribuyendo a la neutrofilia encontrada en sangre.

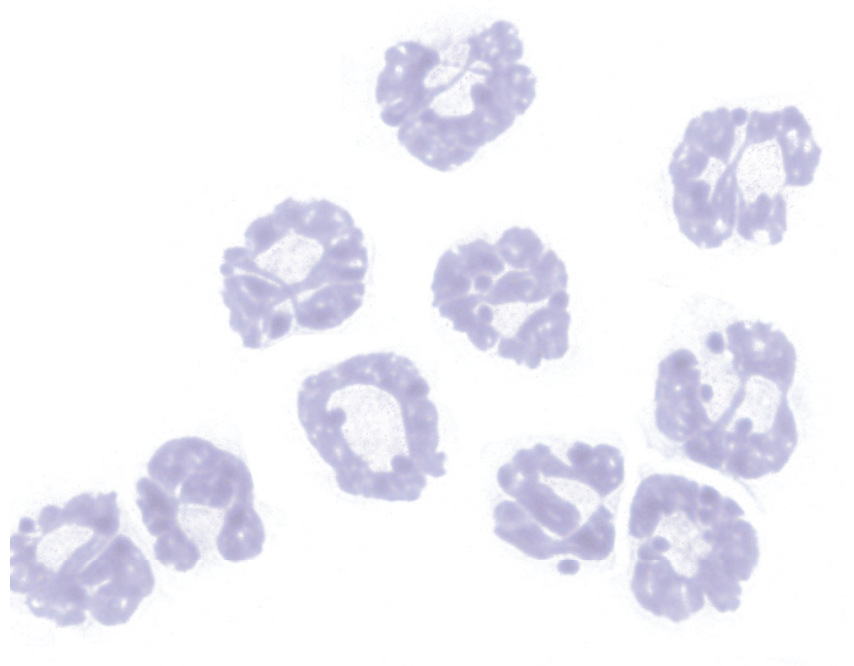
Relacionado con estos hallazgos, recientemente se ha asociado el papel de los receptores nucleares LXRs (*liver X receptors*) con la regulación de este bucle de regulación de granulopoiesis. Ratones deficientes en receptores LXR no eliminan correctamente neutrófilos que acaban acumulándose en sangre, bazo e hígado **(190)**. Nuevamente, mediante ensayos *in vitro* los autores demostraron que la ausencia de señalización a través de LXR favorece una producción mayor de IL-23 en células dendríticas, resultando en un aumento de IL-17 por parte de células T y de G-CSF. Por tanto, la disfunción del eje IL-23/IL-17/G-CSF podría explicar el fenotipo neutrofílico encontrado en estos animales.

Adicionalmente, ciertos receptores y moléculas que median la fagocitosis de neutrófilos preceden la activación de receptores LXR, y están por tanto implicados en la eliminación de neutrófilos. Ratones deficientes en GAS6 –molécula implicada en el reconocimiento del neutrófilo apoptótico por fagocitosis o en su receptor MER desarrollan neutrofilia, lo que sugiere una conexión entre defectos en clearance y granulopoiesis **(190)**. Por otro lado, estudios recientes han demostrado el papel de los transportadores ABC de colesterol en la modulación del nicho hematopoyético. Utilizando animales deficientes para los transportadores ABCA1 y ABCG1, Westerperp y colaboradores de-

mostraron que en estos animales el aumento de los niveles de IL-23 en bazo se correlaciona con una mayor producción de G-CSF, una disminución de los niveles de CXCL12 en médula ósea y finalmente, una movilización de HSPC de este reservorio a sangre **(191)**.

Esta serie de estudios han desvelado por tanto una interesante conexión entre procesos fagocíticos y el metabolismo del colesterol en la regulación de los nichos hematopoyéticos. No existen sin embargo evidencias directas de este tipo de regulación en nichos de células madre hematopoyéticas o de otro tipo.

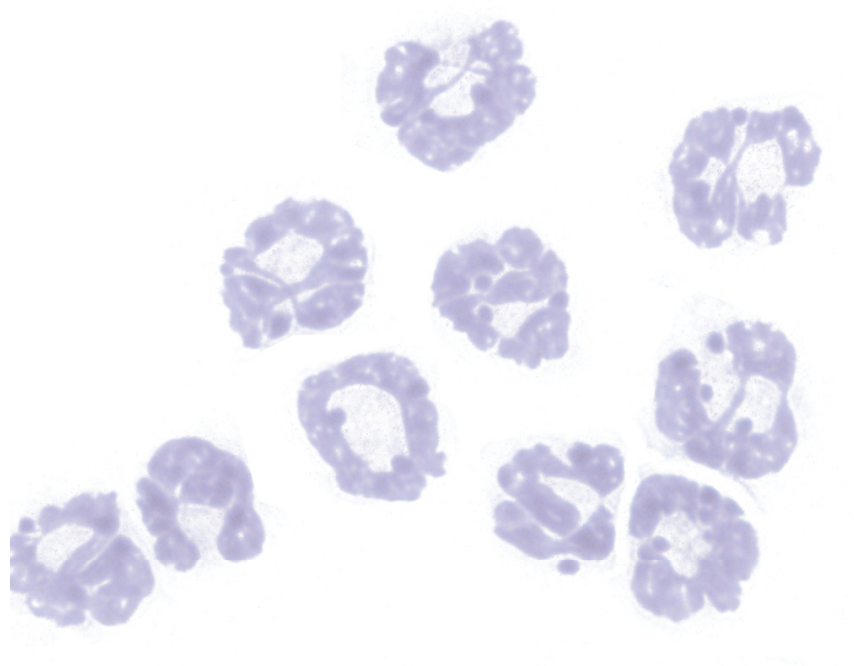
Objetivos



El objetivo principal de este trabajo es analizar las consecuencias fisiológicas de la eliminación natural de neutrófilos envejecidos en el organismo. Los objetivos concretos del estudio son los siguientes:

1. Estudiar y caracterizar el proceso de envejecimiento de neutrófilos *in vivo*.
2. Evaluar la respuesta del nicho hematopoyético como paradigma del efecto de la eliminación de neutrófilos en la fisiología de los órganos donde se produce.
3. Analizar el fenómeno de eliminación de neutrófilos a nivel multiorgánico en ausencia de inflamación.

Resultados



1) Identificación y caracterización del proceso de envejecimiento de neutrófilos

Los neutrófilos son los leucocitos del linaje mieloide más abundantes y efec- tores críticos de la defensa innata del organismo; en torno a 10^7 neutrófilos se generan diariamente en ratones. La generación de neutrófilos o granulopoie- sis tiene lugar en la médula ósea, siendo este el principal reservorio de estas células, de donde se extravasan al torrente sanguíneo y a tejidos de forma constante.

Una característica clave de la biología de neutrófilos es su extremadamente corta vida media. En ausencia de estímulos inflamatorios, los neutrófilos cir- culan en sangre tan sólo entre 6 y 12 horas. La elevada tasa de producción diaria de neutrófilos y una vida media reducida generan la necesidad fisiológi- ca de un control muy preciso en la eliminación en condiciones homeostáticas de neutrófilos, un fenómeno que hemos definido como eliminación homeos- tática o clearance. La desregulación de los mecanismos que promueven la eliminación de estas células podría tener consecuencias fatales para la vascu- latura debido al potencial tóxico que caracteriza a los neutrófilos. En efecto, la actividad de los neutrófilos subyace a múltiples procesos de daño vascular agudo y crónico (192).

1.1 Identificación de neutrófilos envejecidos en circulación.

El proceso de envejecimiento de neutrófilos ha sido descrito previamente en neutrófilos derivados de médula ósea y envejecidos *in vitro*. En estos estudios se demostró que el envejecimiento artificial de neutrófilos ocurre en paralelo a un aumento de la expresión del receptor de membrana CXCR4 y un aumen- to gradual en la apoptosis de estas células (90, 109). La adquisición de este fenotipo anticipa un mayor tropismo hacia CXCL12 -ligando de CXCR4- una quimioquina que se expresa constitutivamente en médula ósea (94). La migración a médula ósea de neutrófilos que expresan el receptor CXCR4 per- mite su eliminación en este órgano (90). Por otro lado, la pérdida o *shedding* de selectina L (CD62L) también se ha relacionado con el envejecimiento de neutrófilos en conejo (193).

En base a estos antecedentes decidimos investigar el perfil de expresión de estos receptores en neutrófilos presentes en la sangre de ratones de fenotipo silvestre o *wild-type* (WT, de ahora en adelante). Razonamos que el proceso

de envejecimiento natural podría alterar la expresión de estos dos receptores en neutrófilos desde el momento en que se liberan de la médula ósea y hasta que son eliminados de la circulación. Usando citometría de flujo detectamos la población de neutrófilos en sangre en base a la expresión del receptor específico Ly6G⁺ (clon 1A8; (194)) y que constituye entre el 8-10% de los leucocitos totales en circulación (Figura 1). A continuación, seleccionamos esta población y comparamos los niveles de expresión de los marcadores CXCR4 y CD62L. Encontramos dos poblaciones en las muestras de sangre: la primera, con niveles altos de expresión de CXCR4 (CXCR4^{HI}) y bajos para CD62L (CD62L^{LO}) corresponde aproximadamente al 33% de los neutrófilos Ly6G⁺ en animales WT. La segunda expresa niveles CXCR4^{LO}CD62L^{HI} y constituye aproximadamente el 66% de los neutrófilos en circulación (Figura 1A).

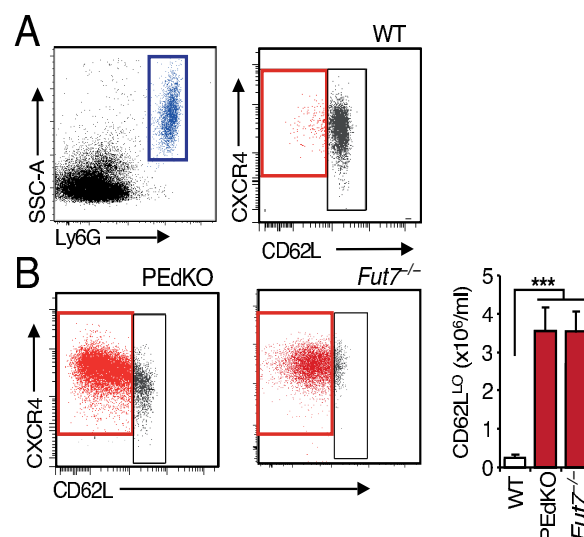


Figura 1: La población de neutrófilos CD62L^{LO} está expandida en ratones con problemas en el tráfico de neutrófilos. A) Análisis por citometría de flujo de neutrófilos de sangre Ly6G⁺ para los marcadores CD62L y CXCR4 en animales WT. B) Sangre analizada por citometría de flujo procedente de animales PEdKO y *Fut7*^{-/-} y cuantificación de la población de neutrófilos CD62L^{LO}. N=5-8 ratones.

A continuación, observamos que la población CXCR4^{HI}CD62L^{LO} se encontraba ampliamente expandida en la sangre de ratones donde la extravasación de neutrófilos está reducida (Figura 1B). Éste es el caso de los neutrófilos en ratones PEdKO que carecen de selectinas endoteliales P y E, y los neutrófilos de los ratones *Fut7*^{-/-} que carecen de la enzima fucosiltransferasa 7, la cual es requerida para la síntesis de ligandos funcionales de selectina (195, 196). La población de neutrófilos envejecidos aparecía incrementada hasta el 82% en ratones PEdKO y al 80% en ratones *Fut7*^{-/-} (Figura 1B).

Por tanto, las células Ly6G⁺CXCR4^{HI}CD62L^{LO} identifican una población de neutrófilos cuyos niveles eran consistentes con un posible “envejecimiento” fisiológico en circulación. Así, en estos modelos murinos deficientes para la extravasación de neutrófilos el aumento de la población Ly6G⁺CXCR4^{HI}CD62L^{LO} se

explicaría porque permanecen retenidos en la circulación y no pueden ser eliminados eficientemente.

Para verificar que el fenotipo alterado de los neutrófilos en estos ratones no se debiese simplemente a la presencia de citoquinas inflamatorias en la sangre de animales PEdKO y *Fut7*^{-/-} (Figura 2A) y (195) generamos y analizamos parejas de parabiontes. La parabiosis permite que dos animales compartan el sistema circulatorio, de modo que se permite la libre circulación de células sanguíneas entre animales genéticamente distintos (37). En estos experimentos el origen de las células que coexisten en el mismo animal de la pareja se puede determinar por la presencia de un gen reportero que diferencia los ratones en parabiosis (ej., transgenes Gfp, DsRed o haplotipo CD45.1). Conectamos la circulación de animales WT con controles WT, con ratones PEdKO y con ratones *Fut7*^{-/-}. Seguidamente identificamos los neutrófilos procedentes del animal WT y observamos que únicamente en el caso de ratones PEdKO (en los que la extravasación de neutrófilos es deficiente por defectos en el endotelio) los neutrófilos WT adquirirían el fenotipo CD62L^{LO}, mientras que los neutrófilos WT presentes en un animal *Fut7*^{-/-} no adquirirían el fenotipo (Figura 2B). Estos resultados demuestran que la adquisición del fenotipo CD62L^{LO} es intrínseca a la célula y no depende de estímulos presentes en circulación.

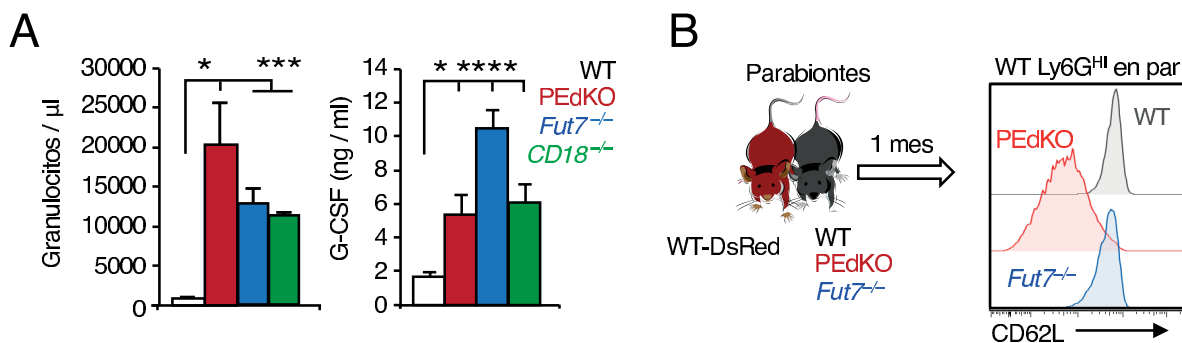


Figura 2: El fenotipo CD62LLO en neutrófilos no está determinado por un entorno inflamatorio.

A) Niveles de neutrófilos en sangre y G-CSF en plasma en animales WT, PEdKO, *Fut7*^{-/-} y *CD18*^{-/-} N=3 ratones. B) La expansión de la población CD62L^{LO} en animales PEdKO y *Fut7*^{-/-} se debe a un déficit en la extravasación de neutrófilos. Los niveles de CD62L se cuantificaron en ratones parabiontes WT-DsRed unidos a animales WT, PEdKO y *Fut7*^{-/-} un mes después de la cirugía. Los histogramas son representativos de 7 parejas de parabiontes.

Tras identificar estas poblaciones con un perfil consistente con un proceso de envejecimiento fisiológico, buscamos demostrar si efectivamente la población más envejecida (CD62L^{LO}) se originaba a partir de la población CD62L^{HI} con el tiempo. Para ello, realizamos el seguimiento in vivo de neutrófilos a lo largo del tiempo. Purificamos neutrófilos CD62L^{HI} procedentes de un ratón WT CD45.1⁺ y los transferimos a un ratón recipiente WT CD45.2⁺, de modo que la presencia de distintas isoformas de CD45 permite discriminar el origen de cada célula. Observamos que gradualmente los neutrófilos CD62L^{HI} se convertían en CD62L^{LO} de modo que a las 8 horas de la transferencia inicial,

la población de neutrófilos CD62L^{LO} había desaparecido de sangre completamente. En contraposición, la inyección de neutrófilos CD62L^{LO} procedentes de la sangre de ratones PEdKO en animales WT no originó neutrófilos CD62L^{HI} y su número descendió progresivamente en circulación (Figura 3A). En ambos escenarios se observó un aumento progresivo de la expresión del receptor CXCR4 en neutrófilos en circulación (Figura 3B). Estos datos indican que la población de neutrófilos CD62L^{HI} origina con el tiempo y de forma espontánea células CD62L^{LO}, sugiriendo que este es un cambio asociado al envejecimiento de neutrófilos.

Para apoyar con una aproximación diferente estas conclusiones, decidimos seguir el fenotipo de los neutrófilos desde su aparición en sangre hasta su eliminación de la misma. Utilizamos dos abordajes distintos para testar esta idea. En el primero de ellos, inyectamos 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) en animales WT previamente tratados con anticuerpos bloqueantes de selectinas endoteliales, con el fin de evitar la extravasación de neutrófilos de sangre. BrdU se incorpora en todas las células en la fase S de síntesis del DNA del ciclo celular, por lo que permite el marcaje metabólico de progenitores mieloides que en sucesivas rondas de diferenciación darán lugar a neutrófilos maduros, los cuales entrarán a formar parte del conjunto de células en circulación (Figura 3C). El análisis por citometría de flujo para determinar el patrón de CD62L en poblaciones discretas de neutrófilos marcados con BrdU mostró que 48 horas después de su inyección la mayoría de los neutrófilos BrdU⁺ eran CD62L^{HI} y que gradualmente se transformaban en CD62L^{LO}, de modo que tras 120 horas todos los neutrófilos mostraban este fenotipo (Figura 3D). En el segundo abordaje, marcamos con biotina *in vivo* la totalidad de células en circulación. La detección posterior por citometría de flujo de las células biotiniladas permitió confirmar que los neutrófilos no biotinilados y que por tanto habían sido generados *de novo* y liberados al torrente sanguíneo, expresaban uniformemente niveles altos de CD62L (Figura 3F).

Estos resultados permiten concluir que la población de neutrófilos Ly6G⁺CXCR4^{HI} CD62L^{LO} corresponde inequívocamente al conjunto de neutrófilos que han envejecido fisiológicamente en circulación. Por contraposición, la población Ly6G⁺ CXCR4^{LO} CD62L^{HI} corresponde a aquellos que han permanecido poco tiempo en circulación tras abandonar la médula ósea (denominados neutrófilos jóvenes). Estos resultados proveen además la primera demostración de que los neutrófilos sufren modificaciones fenotípicas, un proceso que denominamos “envejecimiento”, durante las horas que permanecen en circulación.

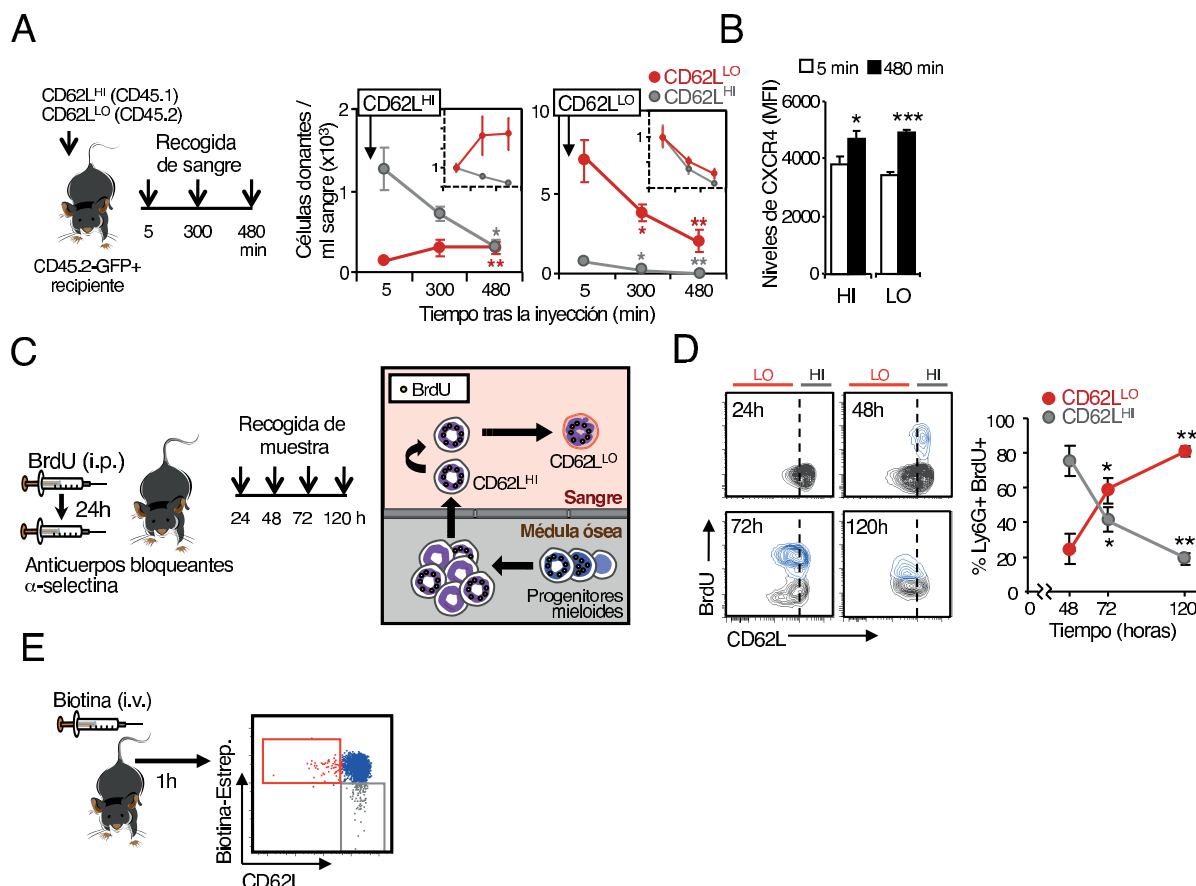


Figura 3: El fenotipo CD62L^{LO} corresponde a neutrófilos envejecidos.

A) Esquema de los experimentos de transferencia de neutrófilos CD62L^{HI} CD45.1⁺ y CD62L^{LO} CD45.2⁺ en ratones recipientes GFP⁺. Los gráficos muestran el número absoluto de neutrófilos CD62L^{HI} ó CD62L^{LO} procedentes de los respectivos donantes a distintos tiempos tras la inyección. El cuadrado en la esquina superior derecha, indica los cambios relativos de cada población. N=5 ratones. La estadística corresponde a los distintos tiempos respecto al tiempo inicial de transferencia (t=5 minutos). **B)** Niveles de CXCR4 en las poblaciones de neutrófilos CD62L^{HI} y CD62L^{LO} tras la transferencia inicial (t=5 minutos) y la final (t=480 minutos). N=5 ratones. **C)** Esquema para el marcaje con BrdU de neutrófilos endógenos. La inyección de BrdU (2,5 mg/ratón) marca los precursores mieloides en ciclo en la médula ósea, los cuales pueden ser detectados 48 horas después en circulación. La inyección de anticuerpos bloqueantes para las selectinas P y E permite extender el tiempo que los neutrófilos marcados con BrdU pasan en circulación evitando su extravasación a tejidos. **D)** Plots de citometría de flujo de densidad y cuantificación de las frecuencias de neutrófilos Ly6G⁺ CD62L^{HI} y CD62L^{LO} marcados con BrdU a distintos tiempos post-marcaje. N=5 ratones. La estadística es frente a los valores medios obtenidos en el tiempo de 48 horas. **E)** Inyección de 1 mg de Sulfo-NHS-LC-biotina en animales WT. La biotina-NHS se une a los residuos -NH de las proteínas de membrana de los neutrófilos en circulación, permitiendo la identificación de neutrófilos frescos como CD62L^{HI} (rectángulo gris) procedentes de médula ósea. Los neutrófilos CD62L^{LO} son biotina+ (rectángulo rojo) lo que indica que ya estaban en circulación en el momento del marcaje. El plot de citometría representa los niveles de CD62L y la biotinilación de neutrófilos Ly6G⁺. N=5 ratones.

1.2 Caracterización fenotípica y molecular de neutrófilos envejecidos en circulación.

Estudios *in vitro* han demostrado que la eliminación de neutrófilos está precedida por un programa de muerte o apoptosis en estas células (110). Con el fin de identificar si el envejecimiento fisiológico de neutrófilos en circulación ocurre en paralelo con la apoptosis en estas células, se analizaron los niveles de fosfatidilserina en membrana de las poblaciones de neutrófilos frescos y envejecidos, mediante su detección por unión a anexina V por citometría de flujo (Figura 4A). En paralelo, comparamos mediante *western blot* los niveles de la

proteína anti-apoptótica MCL1 y los niveles de caspasa 3 fragmentada (cC3) como indicadores de apoptosis. Este análisis se llevó a cabo en poblaciones de neutrófilos derivados de médula ósea envejecidos *in vitro* y neutrófilos tratados con un estímulo pro-apoptótico (Roscovitina, Sigma) como controles. La comparación de los niveles de expresión de MCL1 y cC3 en estas poblaciones en neutrófilos frescos (CD62L^{HI}) y envejecidos (CD62L^{LO}) procedentes de sangre demostró que ninguno de los marcadores de apoptosis era positivo en neutrófilos en circulación (Figura 4B), indicando que el envejecimiento de neutrófilos en circulación es independiente del programa de muerte por apoptosis, al menos en condiciones basales no inflamatorias.

Además de esta caracterización, observamos que el núcleo polimorfo de neutrófilos presenta una mayor hipersegmentación en la población de neutrófilos envejecidos CD62L^{LO} en animales WT, PEdKO y *Fut7*^{-/-} (Figura 4C). La población de neutrófilos envejecidos presenta asimismo un menor tamaño y complejidad celular (determinado por citometría de flujo) en comparación con neutrófilos de fenotipo joven (Figura 4D). Por tanto estos resultados sugieren que el envejecimiento en neutrófilos está asociado a fenómenos que alteran el tamaño y la granularidad de los neutrófilos en circulación.

Por último caracterizamos por citometría de flujo el perfil de expresión de determinados receptores de membrana (Figura 4E). En concreto, encontramos que los neutrófilos envejecidos presentan una expresión mayor de moléculas implicadas en migración como son las integrinas CD11b y CD49d, lo que sugiere una mayor capacidad migratoria para esta población. También encontramos una pequeña disminución en la expresión de CD47, que resulta interesante pues reducciones de esta molécula en superficie están asociadas con eliminación por fagocitosis (197).

Los niveles de leucocitos en sangre fluctúan rítmicamente regidos por los ciclos de luz y oscuridad (es decir, muestran ritmos circadianos) (198). Los niveles de neutrófilos en sangre también presentan esta particularidad (Figura 5B). El número de neutrófilos en sangre asciende rápidamente en el intervalo comprendido entre las 17 horas después del inicio del periodo de luz y las 12 horas siguientes, o ZT17 y ZT5 en terminología circadiana.

Este abrupto aumento alcanza su valor máximo a ZT5 correspondiente a las 12 del mediodía, momento a partir del cual y hasta el inicio de un nuevo ciclo, el número de neutrófilos en circulación disminuye (Figura 5A y B). Los niveles de neutrófilos CXCR4^{HI}CD62L^{LO}, también fluctúan de forma circadiana. Observamos un mayor número de estas células en sangre a ZT5, mientras que su presencia es prácticamente indetectable entre ZT13 y ZT17

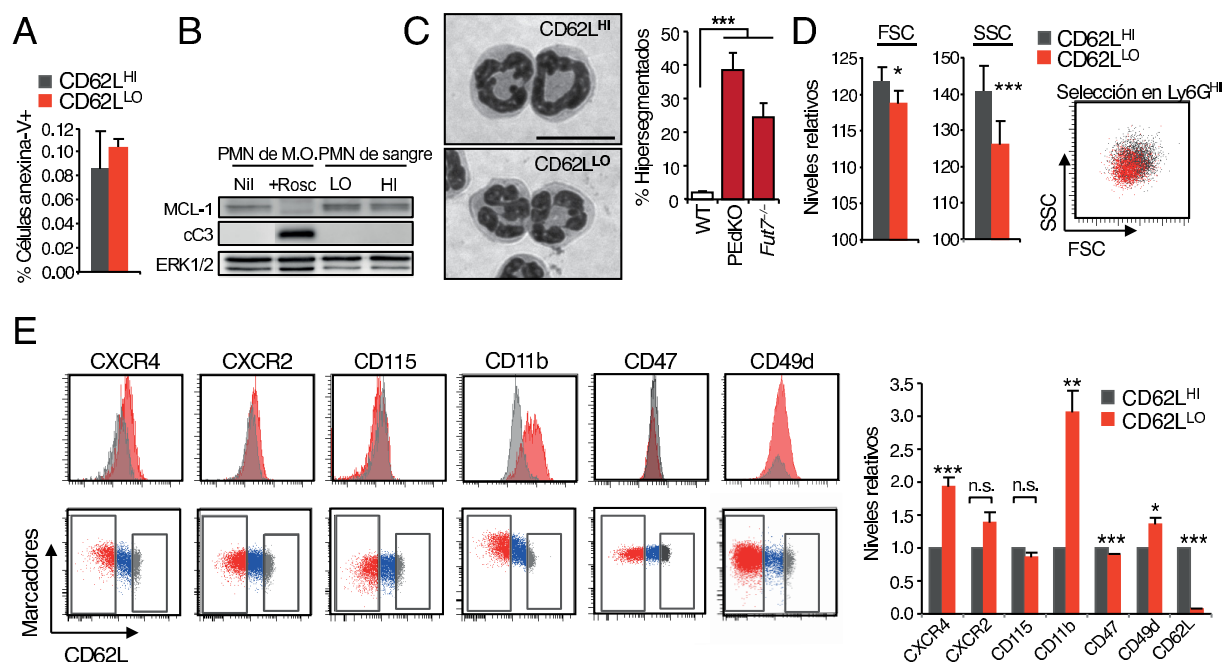


Figura 4: Caracterización del fenotipo de neutrófilos envejecidos.

A) Porcentaje de neutrófilos CD62L^{HI} y CD62L^{LO} anexina positivos en la sangre de animales PEdKO analizado mediante citometría de flujo. N=4 ratones/grupo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de la media. B) Los neutrófilos CD62L^{LO} no son apoptóticos. Niveles de la proteína MCL-1 y caspasa 3 segmentada (cC3) mediante *western blot* de lisados procedentes de neutrófilos CD62L^{LO} y CD62L^{HI} sorteados de sangre ó neutrófilos derivados de médula ósea control o tratados con roscovitina para inducir apoptosis. La membrana es representativa de 2 experimentos independientes. El carril izquierdo correspondiente al control de neutrófilos de M.O. ha sido recortado de otra región de la membrana del mismo gel. C) Imágenes de microscopía de campo claro de aplastados de neutrófilos CD62L^{HI} y CD62L^{LO} purificados mediante *sorting* de sangre. La escala corresponde a 10 μ m. La gráfica muestra la cuantificación de la hipersegmentación del núcleo de neutrófilos en ratones WT, PEdKO y *Fut7*^{-/-}. N=3-4 ratones/genotipo. D) Niveles relativos de tamaño (*forward scatter*, FSC) y complejidad (*side-scatter*, SSC) por citometría de flujo en neutrófilos CD62L^{LO} y CD62L^{HI}. Los valores del eje Y comienzan en el valor 100. N=6-8 ratones. E) Expresión de distintos marcadores de membrana en las poblaciones CD62L^{LO} y CD62L^{HI} en sangre. Ratones PEdKO fueron tratados con 100 mg/kg de fucoidan para inducir la movilización de neutrófilos frescos procedentes de médula ósea. 30 minutos después la sangre fue recogida y analizada por citometría de flujo para la expresión de CD62L con los marcadores indicados. Para el análisis de los niveles relativos de expresión los valores de la intensidad media de fluorescencia fueron calculados del 20% de las células que expresan los niveles más altos de CD62L (CD62L^{HI}, nube de puntos grises) ó del 50% de células que expresan los niveles más bajos de CD62L (CD62L^{LO}, nube de puntos rojos) para cada muestra.

(Figura 5A). El hecho de que a ZT17 la totalidad de neutrófilos en sangre sea CXCR4^{LO}CD62L^{HI} y la evidencia de que los neutrófilos CD62L^{LO} no dan lugar a neutrófilos CD62L^{HI} (Figura 3A) demuestra que los neutrófilos CXCR4^{HI}CD62L^{LO} no vuelven a entrar en circulación. Estas observaciones indican asimismo que las oscilaciones en el número total de neutrófilos circulantes se pueden explicar por la aparición y eliminación fisiológica o clearance de neutrófilos envejecidos.

Para estudiar si estas oscilaciones circadianas en modelos murinos ocurren también en humanos, analizamos muestras de 12 donantes sanos procedentes de un ensayo clínico en el Hospital de La Princesa. Usamos CD16 para identificar neutrófilos humanos y analizamos la expresión de CXCR4 y CD62L en distintos momentos del día. Observamos que en el análisis el perfil de expresión de neutrófilos envejecidos era muy parecido al encontrado en ratones (Figura 6). Igualmente, las fluctuaciones circadianas en neutrófilos envejecidos

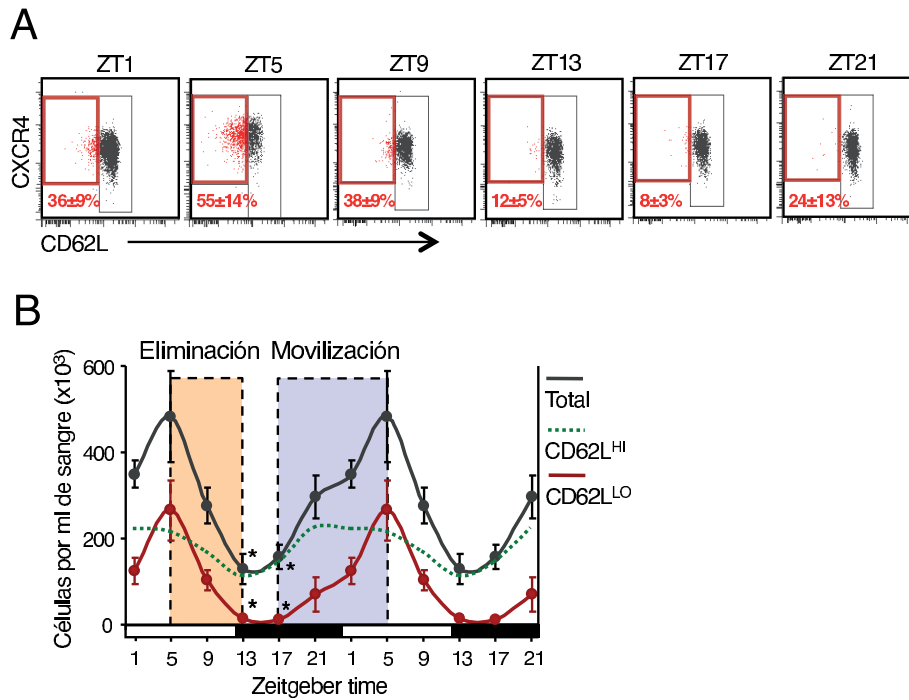


Figura 5: Fluctuación circadiana de los niveles de neutrófilos.

A) Plots representativos de citometría de flujo donde se observan la oscilación en el porcentaje de neutrófilos en sangre CD62L^{LO}CXCR4^{HI} a lo largo del día. B) Cuantificación de los niveles totales de neutrófilos y de las poblaciones CD62L^{HI} y CD62L^{LO}, mostrando el periodo de eliminación (ZT5-13) y de movilización (ZT17-5) de neutrófilos a sangre. N=5-9 ratones.

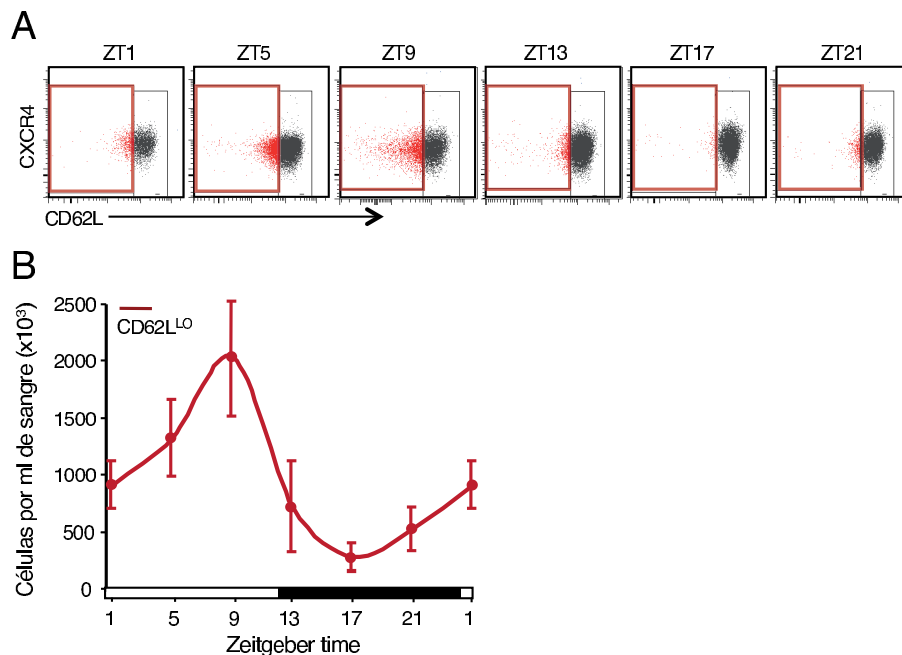


Figura 6: CD62L y CXCR4 identifican la población de neutrófilos equivalente en humanos.

A) Plots representativos de citometría de flujo procedente de sangre de 12 voluntarios para la detección de neutrófilos (CD16⁺) frescos (CXCR4^{LO}CD62L^{HI}) y envejecidos (CXCR4^{HI}CD62L^{LO}) recogidas a los tiempos indicados. B) Cuantificación de la fluctuación de neutrófilos envejecidos en muestras de sangre humanas. El mayor número de neutrófilos envejecidos en circulación se da a ZT9 en humanos con respecto a su mayor concentración a ZT5 en ratones (ver Figura 5B).

se mantienen en humanos. Estos resultados validan la utilización de los receptores CXCR4 y CD62L como marcadores para la detección de neutrófilos envejecidos y sugieren la conservación del fenómeno de envejecimiento en mamíferos.

1.3 Migración de neutrófilos envejecidos a médula ósea.

La eliminación rítmica de neutrófilos envejecidos en sangre descrita anteriormente, plantea la cuestión del impacto que tiene la eliminación de neutrófilos en el órgano u órganos donde este proceso ocurre. El *clearance* de neutrófilos en condiciones basales ha sido previamente descrito en bazo, hígado y médula ósea (106, 110).

En primer lugar centramos nuestra atención en la médula ósea como tejido principal de eliminación de neutrófilos. Este interés se debía a que al igual que la eliminación de neutrófilos de sangre ocurre de forma rítmica y regular, la modulación del nicho hematopoyético está sujeta a fluctuaciones circadianas (60, 93). Dadas estas observaciones, planteamos explorar si la eliminación de neutrófilos y la regulación de la actividad del nicho hematopoyético estarían causalmente conectadas.

Para caracterizar *in vivo* la eliminación de neutrófilos en médula ósea generamos dos modelos murinos deficientes condicionales para CXCR4, el receptor que media la migración de neutrófilos a médula ósea (90, 101). Usamos el sistema de recombinación Cre/loxP el cual permite la eliminación específica de fragmentos de DNA que se encuentran flanqueados por sitios loxP por acción de la recombinasa Cre (199). En el primer modelo, cruzamos ratones CXCR4^{fl/fl} y LysM^{Cre} (de ahora en adelante, ratones MR4) lo que permite la eliminación de CXCR4 en células LysM+ del linaje mieloide (neutrófilos, monocitos y macrófagos). Este modelo fue el empleado durante el primer bloque de experimentos que se presentan en esta tesis. El segundo, más específico de neutrófilos, fue generado a partir de cruces entre CXCR4^{fl/fl} y *hMRP8-Gfp*^{Cre} (de ahora en adelante, NR4) y fue empleado para el resto de experimentos que se incluyen en el segundo y tercer capítulos de esta tesis. A modo de comparativa se muestran los niveles de neutrofilia, perfil de neutrófilos envejecidos, e imágenes representativas procedentes de aplastados celulares de neutrófilos en los dos modelos (Figura 7).

Como habíamos anticipado, los neutrófilos procedentes de animales MR4 ó NR4 no infiltraban específicamente la médula ósea pero sí en bazo, hígado u otros tejidos (Figura 8 y 26). Ambos modelos presentan neutrófilos con fenotipo envejecido CD62L^{LO} e hipersegmentación nuclear (Figura 7), por lo que resultan una herramienta útil para el estudio de la migración de neutrófilos envejecidos dependiente del receptor CXCR4. En particular, nos permiten estudiar las consecuencias de la eliminación fisiológica de neutrófilos en médula ósea, como se detalla en el siguiente apartado.

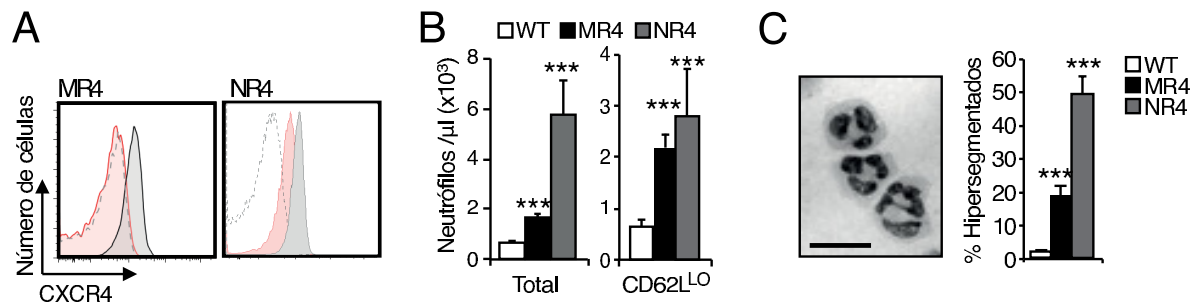


Figura 7: Caracterización de ratones deficientes para CXCR4 en neutrófilos.

A) Expresión de CXCR4 en neutrófilos circulantes procedentes de ratones WT (histograma gris), MR4 y NR4 (histogramas rojos). Las líneas discontinuas marcan el control de isotipo. Todos los animales fueron sangrados a ZT5. N=3 ratones/grupo. B) Niveles de neutrófilos totales y CD62L^{LO} en la sangre de animales WT, MR4 y NR4. C) Imagen de microscopía de campo claro y cuantificación de la hipersegmentación del núcleo en ambos modelos. N=3 ratones/grupo.

2) Eliminación de neutrófilos en médula ósea y regulación del nicho hematopoyético.

La médula ósea es el lugar donde residen las células madre y progenitores hematopoyéticos (HSPC), proporcionando un ambiente rico en factores tróficos y reguladores que modulan el estado quiescente o de diferenciación de estas células (124).

Las HSPC se localizan en asociación con células de origen endotelial y estromal, en contacto con vasos sanguíneos (arteriolas y sinusoides) que irrigan la médula ósea. Como consecuencia de esta localización las HSPC pueden ser rápidamente movilizadas al torrente sanguíneo en condiciones homeostáticas y/o en respuesta a estrés. Diversos estudios han demostrado que la eliminación de uno o varios de los componentes del nicho hematopoyético tiene como resultado la movilización de HSPC al torrente sanguíneo. Por ejemplo, la eliminación de macrófagos (149) o de células reticulares CXCL12 (CXCL12-abundant reticular cells ó células CAR) (92), resulta en la movilización de progenitores de médula ósea. La quimioquina CXCL12 es esencial para la retención de HSPC en médula ósea y la eliminación condicional del gen *Cxcl12* en distintas poblaciones estromales induce la movilización de precursores hematopoyéticos (128, 129).

En los siguientes experimentos investigamos los posibles efectos que el clearance de neutrófilos induce sobre la actividad del nicho hematopoyético de médula ósea. Para ello usamos un ratón reportero para la expresión de CXCL12 (*Cxcl12^{Gfp}*) (142).

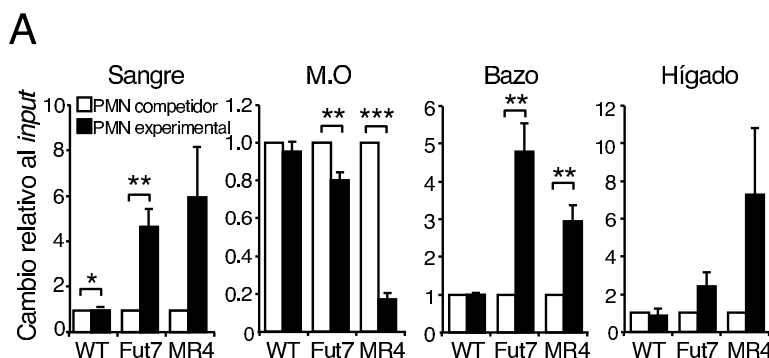


Figura 8: Capacidad migratoria de neutrófilos *Fut7*^{-/-} y MR4 a distintos órganos.

A) Dependencia de ligandos de selectina (Fut7) y CXCR4 para la migración a M.O, hígado y bazo. La migración de neutrófilos de M.O procedentes de ratones *Fut7*^{-/-} y MR4 (barras negras o PMN experimentales) fue evaluada frente a la de neutrófilos WT DsRed (barras blancas o PMN competidor) inyectadas en una mezcla 1:1 en ratones WT recipientes. N=6 ratones por grupo.

2.1 Modulación local del nicho hematopoyético por neutrófilos envejecidos.

La quimioquina CXCL12 se expresa mayoritariamente en células CAR y en progenitores mesenquimales que expresan la proteína nestina (**138, 142**). Para estudiar alteraciones en los niveles de CXCL12 relacionados con la migración de neutrófilos a este órgano, analizamos a continuación las poblaciones celulares que producen CXCL12 o expresan nestina en médula ósea.

Si la eliminación rítmica de neutrófilos afecta al nicho hematopoyético esperaríamos variaciones en el tamaño de éste en distintos momentos del día. Usando ratones *Cxcl12^{Gfp}* observamos en primer lugar que la frecuencia y el número absoluto de células CAR (definidas por citometría de flujo como CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{HI}) oscila periódicamente con valores más elevados a ZT9, indicando que existen variaciones en el tamaño del nicho a distintas horas del día (Figura 9A). A continuación, evaluamos las consecuencias directas del clearance de neutrófilos sobre estos componentes celulares. Para ello, eliminamos los neutrófilos en circulación mediante inyección con anticuerpo anti-Ly6G (194) y analizamos la médula ósea de ratones *Cxcl12^{Gfp}* a ZT5 (12 horas). La eliminación de neutrófilos produjo un aumento del número de células CAR y osteoblastos (CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{LO}) sin que se produjesen cambios en la celularidad total de la médula ósea (Figura 9B).

El aumento en el número de células CXCL12⁺ que forman parte del nicho hematopoyético ocurrió en paralelo a un aumento en los niveles de transcripción de *Cxcl12* así como en los niveles de proteína en la médula ósea de los animales cuyos neutrófilos habían sido eliminados (Figura 9C). Sin embargo, esta reducción no produjo cambios en el número de células nestina (determinados en ratones *Nestin*^{Gfp}; (Figura 9D), indicando que la regulación de neutró-

filos en nicho está dirigida específicamente a células CAR.

Mediante ensayos de proliferación con BrdU observamos además que el aumento en la proporción de células CAR se explica por un aumento en la tasa de proliferación de estas células. La proliferación no afectaba sin embargo los niveles de transcripción de *Cxcl12* en células CAR purificadas (Figura 9E). Estos resultados revelan una regulación del nicho hematopoyético por parte de neutrófilos que resulta en cambios en la producción de CXCL12 de las células CAR.

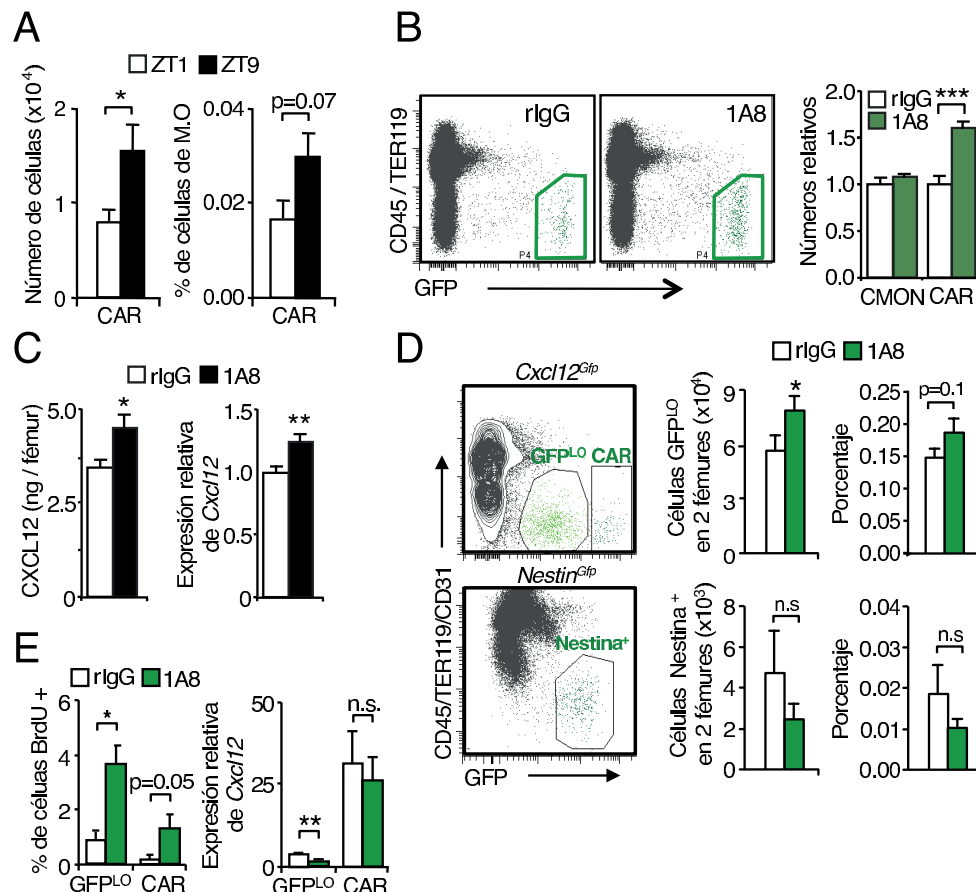


Figura 9: La eliminación de neutrófilos circulantes aumenta la capacidad retentiva del nicho hematopoyético.

A) Número absoluto y porcentaje de células CAR en la M.O de ratones *Cxcl12^{Gfp}* a ZT1 y ZT9. N=8 ratones por grupo. **B)** Plots representativos de citometría de flujo y números relativos de células de M.O nucleadas (CMON) y células CAR (verde) en la M.O de ratones *Cxcl12^{Gfp}* tratados con rIgG ó anti-Ly6G (1A8). Las muestras de M.O fueron analizadas a ZT5 (n=9 ratones). **C)** Niveles de proteína y transcripción de *Cxcl12* en la M.O de los grupos analizados en B). N=7-9 ratones. **D)** Análisis por citometría de flujo de la M.O de animales *Cxcl12^{Gfp}* y *Nestin^{Gfp}* para cuantificar el número de células CD45^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{LO} (osteoblastos), CAR y células nestina+. Las barras representan un aumento en el número absoluto y la frecuencia de células GFP^{LO} pero no en las células nestina+ de animales tratados con Ly6G. N=4-6 ratones por grupo. **E)** Efecto de la eliminación de neutrófilos circulantes en el porcentaje de osteoblastos y CAR proliferando (BrdU+) y en la expresión relativa de *Cxcl12* en la M.O de ratones *Cxcl12^{Gfp}*. N= 9 ratones.

Los niveles de CXCL12 en médula son determinantes para la retención de HSPC dentro de este compartimento. Reducciones en los niveles de esta quimioquina en condiciones basales o de movilización de HSPC inducidas con tratamiento farmacológico promueven la movilización de HSPC de médula a sangre (92, 93). En nuestros experimentos observamos que los animales

tratados para la eliminación de neutrófilos con el anticuerpo anti-Ly6G presentaban una reducción del 60% de progenitores en circulación, medido por los niveles de unidades formadoras de colonias en cultivo (CFU-C) y por análisis por citometría de flujo de los niveles de precursores hematopoyéticos (definidos como $\text{Lin}^{\text{NEG}}\text{Sca1}^+\text{cKit}^+\text{Thy1}^{\text{LO}}\text{Flk2}^{\text{NEG}}$ o LSKTF) (Figura 10A).

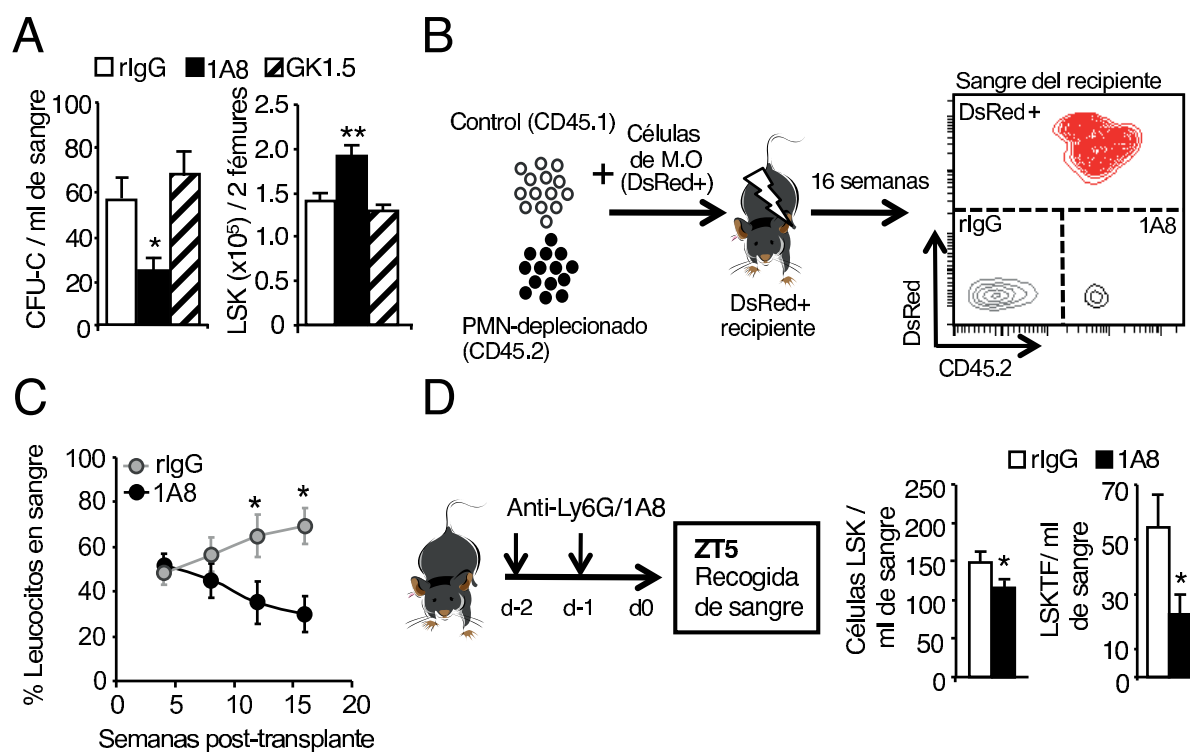


Figura 10: La eliminación de neutrófilos disminuye el número de HSPC en circulación.

A) Número de CFU-C en sangre y células LSK en la médula ósea de animales control rIgG y tratados para la eliminación de neutrófilos (1A8) y células T (anti-CD4, clon GK1.5). Las muestras fueron analizadas a ZT5. N=5-16 ratones. B) Esquema que representa la estrategia seguida para los ensayos de reconstitución de médula ósea con donantes de sangre control o tratados con anti-Ly6G. C) Porcentaje de leucocitos en sangre en animales transplantados con HSC presentes en la circulación de animales control (rIgG) o tratados con anti-Ly6G. La cuantificación representa la reconstitución de leucocitos totales procedentes de cada haplotipo (CD45.2/CD45.1) durante 16 semanas. N=5 ratones/grupo. D) Esquema experimental y cuantificación del número de HSC más primitivas en los grupos mostrados en A. Mediante citometría de flujo se identificaron las poblaciones enriquecidas en HSC ($\text{Lin}^{\text{NEG}}\text{Sca-1}^+\text{cKit}^+$, ó LSK) y progenitores $\text{Lin}^{\text{NEG}}\text{Sca-1}^+\text{cKit}^+\text{Thy1.2}^+\text{Flk2}^{\text{NEG}}$ (LSKTF). El número de HSC / ml de sangre fue calculado utilizando el número de leucocitos totales. N=8 ratones/grupo.

Estos cambios se observaron también en la disminución de células hematopoyéticas con capacidad de reconstitución a largo plazo presentes en sangre en condiciones basales. Ensayos de reconstitución competitiva en animales transplantados con una mezcla de sangre procedente de animales control o tratados con anti-Ly6G demostraron una reconstitución hematopoyética tras 16 semanas significativamente reducida en el grupo de animales tratados con anti-Ly6G (Figura 10B-D). Estos experimentos indican por tanto que la eliminación de neutrófilos previene la movilización homeostática de progenitores y células madre hematopoyéticas a circulación.

Los datos anteriores sugieren que la capacidad retentiva del nicho en animales con niveles reducidos de neutrófilos está incrementada como consecuencia

del aumento de los niveles de CXCL12. Para correlacionar estos datos con su disminución en sangre cuantificamos los niveles de HSPC en médula ósea. Observamos que la eliminación de neutrófilos ocasionaba un aumento en el número de células LSK (Figura 10A). Este cambio en la distribución de HSPC estaba específicamente asociado a neutrófilos, ya que la eliminación de células T usando un anticuerpo contra CD4 no produjo las alteraciones en los niveles de progenitores. Como control adicional a estos experimentos y para excluir posibles efectos citotóxicos del anticuerpo sobre la población de HSPC, tratamos animales *Fut7*^{-/-} con el mismo régimen de anticuerpo anti-Ly6G. Observamos que la eliminación de neutrófilos en este modelo no inducía cambios en la distribución de HSPC en sangre y médula ósea, confirmando así la falta de toxicidad del tratamiento (Figura 11) y reforzando la hipótesis de que el tráfico intacto de neutrófilos a médula ósea, el cual está parcialmente impedido en ratones *Fut7*^{-/-} (Figura 8A), es necesario para la modulación local del nicho hematopoyético.

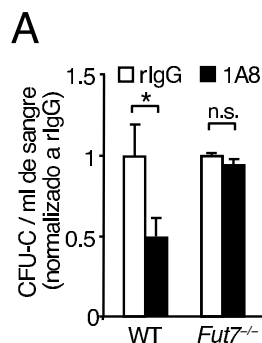


Figura 11: Efecto de la eliminación de neutrófilos en animales *Fut7*^{-/-}

A) Niveles de progenitores CFU-C en la sangre de animales WT y *Fut7*^{-/-} control (rlgG) y tratados con anti-Ly6G. N=8 ratones/grupo. Los valores han sido normalizados al grupo control (rlgG) en cada caso.

En conjunto estos resultados confirman que la eliminación de neutrófilos circulantes altera la distribución de progenitores hematopoyéticos entre médula ósea y sangre.

Dado lo inesperado de estos hallazgos y para confirmarlos usando una aproximación diferente, evaluamos las alteraciones del nicho hematopoyético en respuesta a transferencia de neutrófilos purificados. Neutrófilos derivados de médula ósea previamente envejecidos *in vitro* se inyectaron en animales WT. El análisis de la médula ósea de estos animales por citometría de flujo mostró una reducción parcial del número de células CAR (Figura 12A), acompañada de una reducción significativa de los niveles de quimioquina CXCL12 (Figura 12B). Estos resultados se correlacionaron con un aumento de 2,4 veces el número de CFU-C y precursores LSKTF en sangre (Figura 12D), sin cambios en el número de leucocitos maduros (Figura 12C). Esta respuesta se pudo reproducir al inyectar neutrófilos CD62L^{LO} derivados de sangre (Figura 12C). Sin embargo, la movilización de HSPC no se produjo al transferir leucocitos

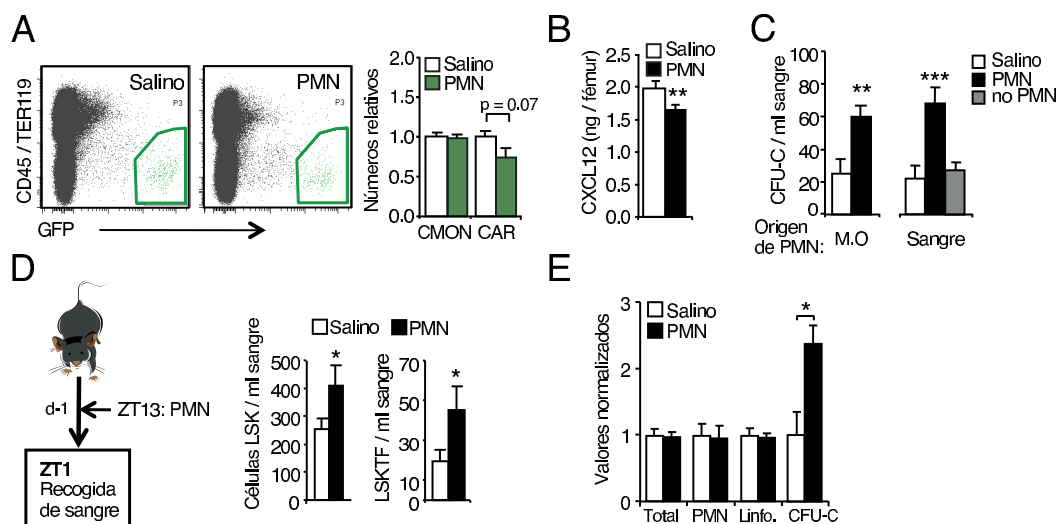


Figura 12: Modulación del nicho hematopoyético por transferencia de neutrófilos.

A) Plots representativos de citometría de flujo y números relativos de células CAR (región en verde) y células de M.O nucleadas (CMON) en ratones *Cxcl12^{Gip}* tratados con suero salino o con neutrófilos. La M.O de estos animales fue analizada a ZT1. N=7-10 ratones/por grupo. **B)** Niveles de CXCL12 en el fluido extracelular de M.O de los grupos mostrados en A). N=10-14 ratones. **C)** Número de progenitores CFU-C en la sangre de ratones tratados con neutrófilos derivados de médula ósea ó sangre, o con leucocitos de sangre donde la población de neutrófilos ha sido eliminada (no PMN). Las muestras fueron analizadas a ZT1. Los niveles basales de CFU-C en sangre son diferentes a los mostrados en la Figura 10A porque las muestras fueron recogidas a distintos tiempos, ZT5 y ZT1, respectivamente. N=6-14 ratones. **D)** Esquema experimental y efecto de la transferencia de neutrófilos en HSC primitivas, analizadas como la Figura 10D. N=9 ratones por grupo. **E)** Sólo los progenitores hematopoyéticos (CFU-C) se ven afectados por la transferencia de neutrófilos. Los neutrófilos fueron transferidos a ZT13 y las muestras recogidas a ZT1. N=6-9 ratones por grupo.

totales de sangre privada de neutrófilos, indicando de nuevo la especificidad de esta respuesta a neutrófilos (Figura 12E).

Para determinar si la exposición crónica a un elevado número de neutrófilos envejecidos podría modular el nicho hematopoyético en médula ósea, conectamos quirúrgicamente la circulación (parabiosis) de ratones WT *Tg-Gfp* y ratones PEdKO, cuya sangre está enriquecida en neutrófilos envejecidos (Figura 13A). Un mes después analizamos los niveles de progenitores hematopoyéticos de origen WT -distinguibles por la expresión de la proteína GFP- y se observó un incremento de 3 veces el número de CFU-C con respecto al basal encontrado en parejas WT-WT. No se observaron sin embargo cambios en los niveles de progenitores derivados del animal PEdKO, indicando que la movilización de neutrófilos a través de un endotelio intacto precede la movilización de HSPC (Figura 13B).

En estos experimentos sin embargo era posible que la movilización de precursores WT se debiese a la presencia de citoquinas movilizadoras descritas en la sangre del ratón PEdKO (195). En nuevos ensayos de parabiosis encontramos que la elevación en el número de progenitores observada en animales WT no es consecuencia de la presencia de agentes movilizadores en la sangre del animal PEdKO ni de la transferencia pasiva de neutrófilos procedentes del animal PEdKO al WT. En efecto, al conectar la circulación de ratones WT

con animales *Fut7^{-/-}*, cuyos niveles G-CSF en plasma y neutrofilia son comparables a los de ratones PEdKO (Figura 2A), no observamos un aumento de progenitores en circulación (Figura 13D). Esto se explica porque los neutrófilos *Fut7^{-/-}* tienen comprometida la migración a tejidos (Figura 8 y 26). Además cuando la pareja parabionte estaba compuesta por ratones WT y MR4 no observamos movilización de progenitores derivados del animal WT, lo que demuestra que los neutrófilos requieren la entrada en médula ósea mediada por el receptor CXCR4 para modular el nicho hematopoyético (Figura 13A).

En resumen estos datos demuestran que las elevaciones en los niveles de neutrófilos, bien agudas (transferencia) o crónicas (parabiosis) promueven la movilización de progenitores hematopoyéticos a sangre, mientras que la ausencia de neutrófilos induce su acumulación en médula ósea. Los datos indican asimismo que la entrada de estos neutrófilos a médula ósea es esencial para inducir esta movilización.

Para dar un contexto funcional a nuestras observaciones en el nicho realizamos ensayos de migración de progenitores y células madre hematopoyéticas a médula ósea, en paralelo con ensayos de movilización inducida farmacológicamente. En estos experimentos testamos la capacidad del nicho de ratones con distintos tratamientos para atraer o retener HSPC, respectivamente. Mediante microscopia intravital y citometría de flujo observamos que la migra-

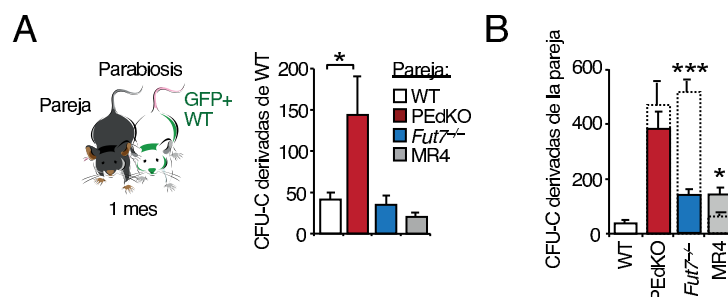


Figura 13: Modulación del nicho hematopoyético por exposición crónica a neutrófilos envejecidos.

A) Esquema de los experimentos de parabiosis y número de CFU-C de sangre procedentes del animal WT *Tg-Gfp* un mes después de la cirugía con los mutantes que se muestran en la leyenda. N=5-12 parejas de parabiontes total.

B) Número de CFU-C presentes en animales WT o en los mutantes conectados mediante parabiosis a animales WT *Tg-Gfp*. Los valores corresponden a las parejas de los animales mostrados en A). La línea de puntos indican los niveles basales de estos animales en condiciones de no parabiosis. N=5-12 parejas de parabiontes.

ción de células 32D (línea celular promielocítica) y células LSK a médula ósea de calvaria y hueso femoral, se encontraba aumentada un 40% en animales tratados con anti-Ly6G (Figura 14A y B). Además, las células que migraban a médula ósea se localizaban principalmente en zonas enriquecidas en células CAR (Figura 14D). Estos resultados confirman funcionalmente el aumento de células CAR tras la eliminación de neutrófilos (Figura 9B).

Para los ensayos de movilización, eliminamos neutrófilos en un grupo de ratones y posteriormente tratamos con un agente movilizador (el antagonista de CXCR4, AMD3100) (159). Este tratamiento produjo un aumento del 40% en los niveles de HSPC movilizados a sangre comparado con animales en los que los neutrófilos no habían sido eliminados (Figura 14E). Este aumento en el número de progenitores movilizados se podría explicar por el hecho de que la eliminación de neutrófilos genera un nicho con mayor número de precursores movilizables (Figura 10A); no podemos descartar sin embargo que la eliminación de neutrófilos promueva una reordenación física del propio nicho y aumente el reservorio de progenitores susceptible de ser movilizados.

En conjunto, estos resultados indican que la regulación del nicho hematopoyético en condiciones homeostáticas requiere la migración activa de neutrófilos circulantes a médula ósea a través de mecanismos dependientes de selectinas y CXCR4.

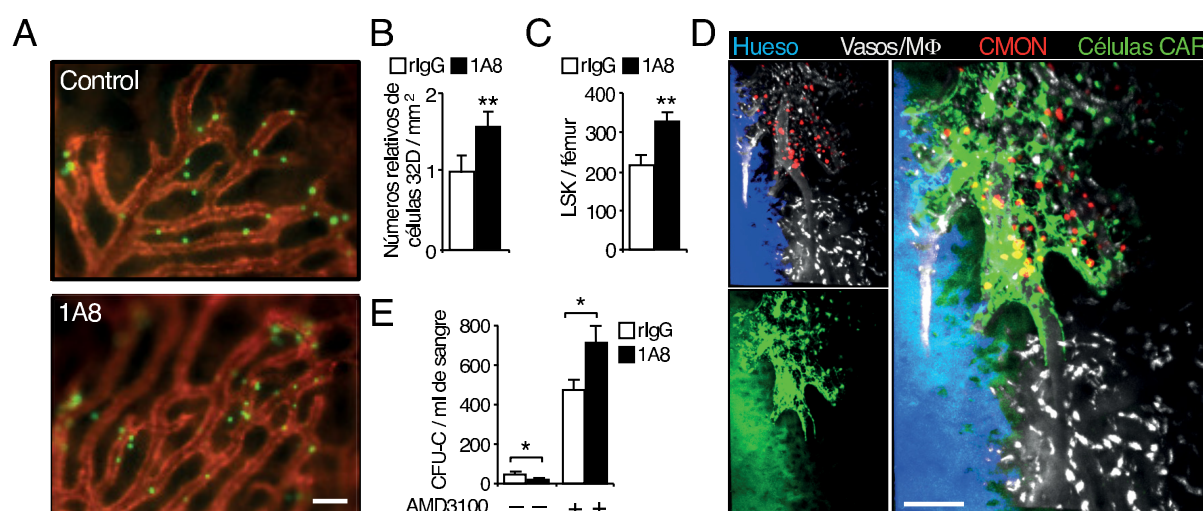


Figura 14: Los neutrófilos modulan la capacidad del nicho hematopoyético de atraer y retener progenitores hematopoyéticos. A) Imágenes representativas de la migración de células 32D (en verde) a M.O y vasos sanguíneos (rojo) en ratones control y tratados con Ly6G (1A8). La escala representa 100 μ m. B) Cuantificación de las células que han migrado por área de vaso sanguíneo a la M.O de ratones control (rlgG) o cuyos neutrófilos han sido eliminados (1A8). Estos valores fueron obtenidos de los experimentos mostrados en A). N=4-5 ratones. C) Número relativo de células LSK de M.O de un donante DsRed⁺ que se asientan en la M.O de ratones control (rlgG) o de ratones tratados para la eliminación de neutrófilos (anti-Ly6G 1A8). Valores analizados por citometría de flujo. N=5-6 ratones. D) Células de M.O del donante DsRed⁺ (rojo, CMON) migran y se asientan en áreas exclusivamente enriquecidas en células que producen CXCL12 (verde). El recuadro inferior a la izquierda denota la autofluorescencia en verde del hueso que puede ser excluida posteriormente por el canal azul, que destaca mediante la adquisición de señal segundo armónico del hueso. Los paneles de la izquierda se muestran superpuestos en la imagen de mayor tamaño de la derecha. Las imágenes son representativas de 4 ratones *Cxcl12^{Gfp}* analizados mediante microscopía intravital multifotón. La escala representa 100 μ m. E) Movilización de animales control (rlgG) o tratados con anti-Ly6G (1A8) y tratados posteriormente con AMD3100. N=5-6 ratones.

2.2 Mediadores moleculares y celulares de la regulación del nicho hematopoyético: macrófagos residentes, células productoras de CXCL12 y receptores nucleares LXR.

Los resultados de los experimentos de parabiosis demuestran que la migración de neutrófilos a médula ósea es necesaria para la modulación del nicho hematopoyético.

Con el fin de investigar los mecanismos responsables de esta modulación, realizamos microscopía de alta resolución en la médula ósea. Mediante *laser scanning cytometry* analizamos por microscopía de fluorescencia la localización de neutrófilos DsRed+ extravasados en la médula femoral de animales *Cxcl12^{Gfp}*. Esta técnica permite construir un panel de imágenes que se pueden unificar para examinar la estructura de un órgano completo con resolución microscópica. De esta manera pudimos discriminar los neutrófilos (DsRed+), los macrófagos (CD169+), las células CAR (mediante la expresión de GFP) y el hueso (mediante el láser segundo armónico). Mediante esta técnica cuantificamos la distancia entre los neutrófilos eliminados en médula ósea y otras células o estructuras de interés dentro de este órgano.

Independientemente de su origen, los neutrófilos transferidos se localizaron en proximidad o contacto directo con macrófagos residentes de médula ósea identificados como células CD169+ (40% en contacto directo y el 78% de los neutrófilos a una distancia inferior de 20 μm) (Figura 15A y B). Sin embargo, no detectamos una migración preferencial de neutrófilos a células CAR o a la zona endosteal -en contacto con la superficie ósea-. Mediante microscopía multifotón en la médula ósea de calvaria en animales vivos pudimos confirmar que los neutrófilos que infiltran la médula establecen interacciones dinámicas y frecuentes con macrófagos en médula ósea pero no con células CAR (Figura 15C).

Dado que estudios anteriores han demostrado la eliminación por fagocitosis de neutrófilos en médula ósea (110) consideramos la posibilidad de que los neutrófilos que migran a médula ósea fuesen fagocitados por macrófagos. Para comprobar esta posibilidad, diseñamos un sistema de detección de fagocitosis por citometría de flujo que permitiese cuantificar aquellas células que fagocitan neutrófilos. Se transfirieron neutrófilos CD62L^{HI} y CD62L^{LO} marcados con CFSE a ratones WT y 4 horas después se analizó el número de células CFSE+ en las poblaciones Gr1⁺F4/80^{NEG}, correspondiente a neutrófilos extravasados en médula ósea, y Gr1^{NEG}F4/80^{HI}, que identificaría macrófagos que han fagocitado neutrófilos (Figura 15D). Un 8% de los neutrófilos analiza-

dos se encontraban asociados con macrófagos y un 0,4% de los macrófagos de médula ósea fagocitaban neutrófilos. Sorprendentemente, encontramos que aunque ambas poblaciones de neutrófilos, CD62L^{HI} y CD62L^{LO}, migraban con igual eficiencia a médula ósea, los neutrófilos CD62L^{LO} eran fagocitados un 73% más eficientemente que los neutrófilos jóvenes CD62L^{HI} (Figura 15E). Estos resultados indican la existencia de una fagocitosis preferencial de neutrófilos envejecidos una vez que entran en la médula ósea.

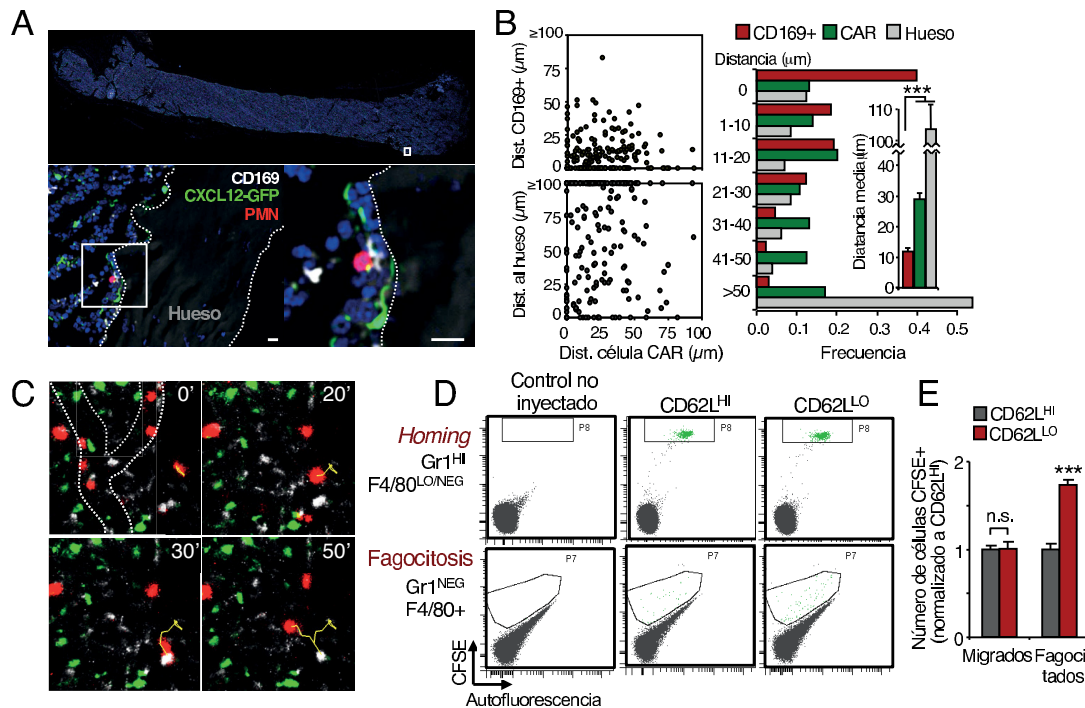


Figura 15: Interacción y fagocitosis en la médula ósea de macrófagos y neutrófilos eliminados de sangre.

A) Secciones de la médula femoral de ratones *Cxcl12^{Gfp}* inyectados con neutrófilos envejecidos DsRed⁺. La escala representa 10 μ m. B) Representaciones gráficas que muestran las distancias entre neutrófilos que han migrado a médula ósea y la superficie del hueso, a macrófagos CD169⁺ ó a células CAR. La cuantificación de las distancias medias así como la frecuencia de estas interacciones aparecen representadas en las barras horizontales. N=198 neutrófilos de 3 ratones. C) Imágenes procedentes de microscopía intravital de neutrófilos DsRed⁺ en la M.O de ratones *Cxcl12^{Gfp}*. Las líneas amarillas indican la trayectoria durante 50 minutos de un neutrófilo (cabeza de flecha naranja a t=0) que secuencialmente se dirige hacia dos macrófagos (cabeza de flecha blanca a t=0) pero no hacia células CAR (verde). Las líneas punteadas en el panel de la esquina izquierda delimitan los vasos sanguíneos. Escala = 10 μ m. D) Estrategia por citometría de flujo para la detección de neutrófilos CD62L^{HI} y CD62L^{LO} que han migrado o han sido fagocitados por macrófagos de M.O. Neutrófilos de los dos subtipos fueron marcados con CFSE, mezclados en cantidades proporcionales y transferidos en recipientes WT. La médula ósea de los animales recipientes fue recogida 4 horas después e incubada con los anticuerpos correspondientes para la detección de neutrófilos que habían migrado (Gr1^{HI} F4/80^{LO/NEG}; plots superiores) y aquellos que habían sido fagocitados (Gr1^{NEG} F4/80⁺; plots inferiores). Un control no inyectado se incluyó en todos los análisis para discriminar las poblaciones. E) Cuantificación de migración y fagocitosis competitiva de neutrófilos CD62L^{HI} y CD62L^{LO} marcados con CFSE en médula ósea. N=5 ratones.

La eliminación de neutrófilos por macrófagos en médula ósea planteó la posibilidad de que la modulación de nicho hematopoyético tuviese lugar a través de la actividad fagocítica de estas células. Para testar esta hipótesis, eliminamos macrófagos de la médula ósea de ratones vivos mediante la inyección de liposomas cargados con clodronato (149) (Figura 16A y B). Comprobamos que en el momento del análisis la población de macrófagos seguía eficientemente reducida mientras que los niveles basales de progenitores circulantes no esta-

ban alterados. En estas condiciones, repetimos la transferencia de neutrófilos con el fin de determinar la respuesta del nicho hematopoyético en ausencia de macrófagos. Sorprendentemente, no observamos alteraciones en los niveles de progenitores en circulación ni en los niveles de CXCL12 en médula ósea observados en presencia de macrófagos (Figura 16C). Estos resultados demuestran un papel fundamental de macrófagos medulares para la modulación del nicho hematopoyético en respuesta a la eliminación de neutrófilos envejecidos.

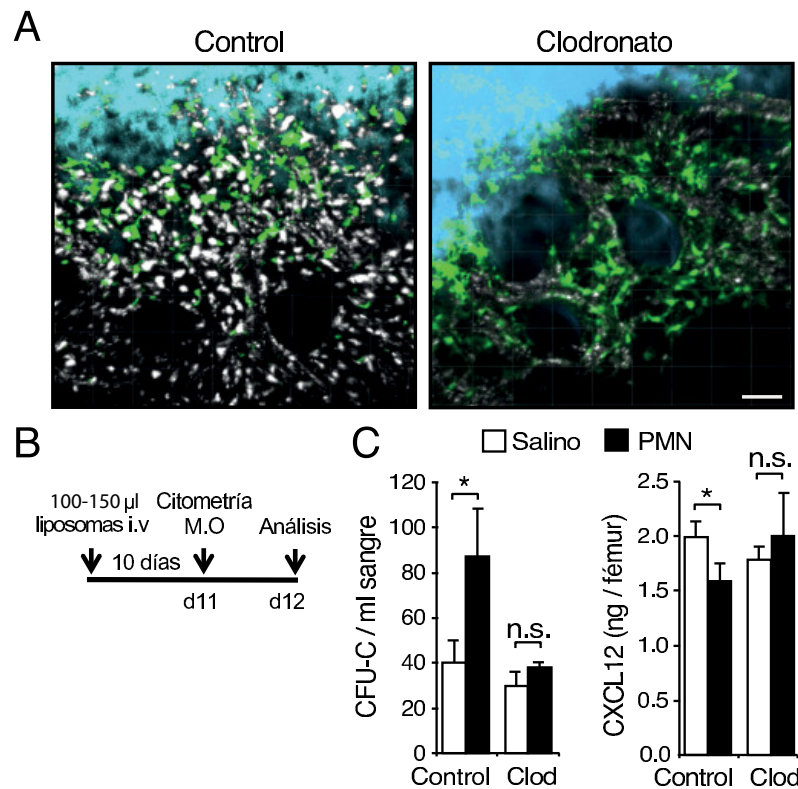


Figura 16: Los macrófagos medulares son necesarios para la respuesta del nicho a neutrófilos.

A) Imágenes de microscopía intravital multifotón en ratones *Cxcl12^{Gfp}* inyectados con 50 mg de dextrano (10KDa) conjugado con el fluorocromo Alexa 647. El hueso aparece en azul y las células CAR se visualizan mediante la expresión de GFP en verde. Las células marcadas con dextrano se visualizan en el canal rojo lejano (blanco). Estructuras pertenecientes a células se visualizan a medida que el dextrano difunde en el parénquima, 10 minutos después de su inyección (izquierda, ratón control). Estas estructuras desaparecen en ratones tratados con liposomas cargados clodronato (derecha), indicando que el dextrano marca macrófagos. Escala= 50 µm. **B)** Esquema del protocolo utilizado en el experimento de eliminación de macrófagos con clodronato. Médula ósea (M.O). **C)** CFU-C de sangre y niveles de la proteína CXCL12 en la M.O de ratones control tratados con suero salino o con clodronato (clod) para la eliminación de macrófagos seguido de la inyección de 10^6 neutrófilos. N=5 ratones.

Los receptores nucleares LXR han sido identificados como reguladores transcripcionales de la respuesta anti-inflamatoria en macrófagos tras la fagocitosis de células apoptóticas (190, 200). En médula ósea, encontramos que los macrófagos son la población de origen hematopoyético que mayoritariamente expresa los genes codificantes para estos receptores, si bien también detectamos expresión de ambas isoformas (LXR α y β) en osteoblastos, células CAR, endotelio y células estromales (Figura 17A).

Para investigar si la activación de receptores LXR era responsable de la modulación observada en nicho hematopoyético, analizamos en primer lugar la

expresión de genes diana de receptores LXR en la médula ósea durante ciclos de luz y oscuridad. Estudiamos en particular la expresión a nivel transcripcional de los genes *Abca1* y *Mertk*, dos genes que se expresan tras la activación de receptores LXR y que han sido previamente implicados en fagocitosis y en el transporte reverso de colesterol (200). Observamos que ambos genes presentan oscilaciones circadianas en su expresión y que además tenían un patrón en antifase con los niveles de neutrófilos en sangre (Figura 17B). Las oscilaciones en los niveles de expresión de estos genes precedían además la disminución de los niveles de expresión de *Cxcl12* en médula ósea (Figura 17C), estableciendo una posible relación entre la activación de LXR y la modulación de la actividad del nicho hematopoyético en condiciones fisiológicas.

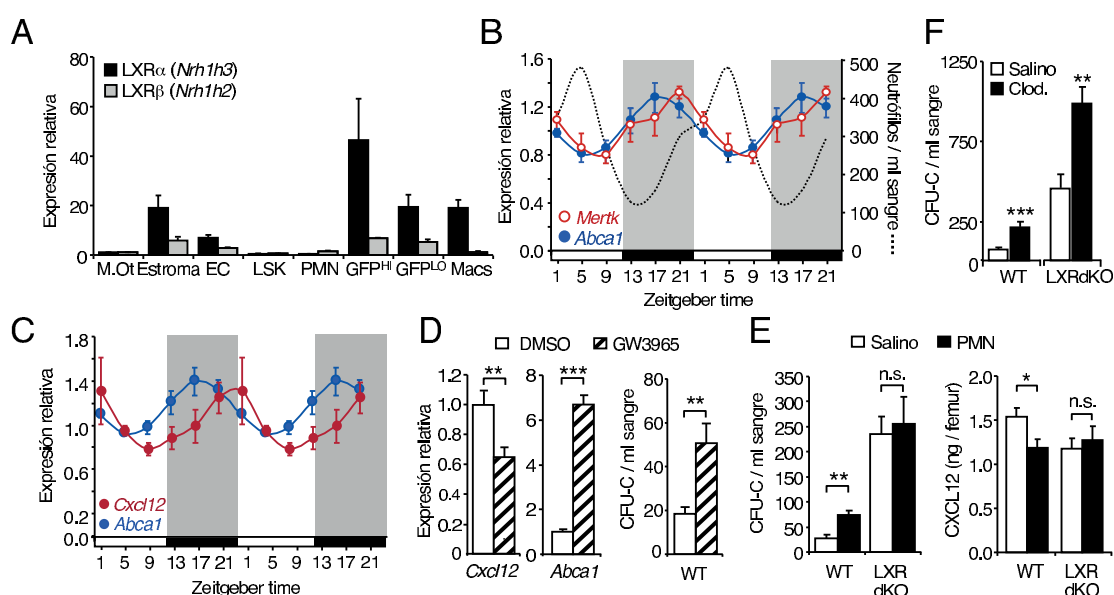


Figura 17: Requerimiento de receptores nucleares LXR para la modulación del nicho hematopoyético. A) Expresión relativa de los genes codificantes para LXR α y β en distintas poblaciones de la M.O. M.O. total (M.Ot), células estromales ($CD45^{NEG}TER119^{NEG}CD31^{NEG}$), células endoteliales ($CD45^{NEG}TER119^{NEG}CD31^{+}$), progenitores LSK, neutrófilos (PMN), células productoras de CXCL12 ($CD45^{NEG}TER119^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{HI}$ y GFP^{LO}) y macrófagos (Macs). Las muestras proceden de 2 experimentos independientes donde las muestras fueron mezcladas para cada tipo celular. B) Niveles relativos de expresión génica de *Mertk* y *Abca1* a diferentes ZT a lo largo del día. La línea de puntos indica los niveles de neutrófilos en sangre. Los rectángulos en gris delimitan los periodos de oscuridad. N=4-9 ratones por tiempo. C) Análisis de los niveles de transcripción de *Cxcl12* y *Abca1* en la M.O. de animales WT a distintos tiempos ZT a lo largo del día. La expresión de ambos genes sigue fluctuaciones circadianas desplazadas 8 horas entre sí aproximadamente. Los rectángulos grises indican periodos de oscuridad. N=5-9 ratones por tiempo. D) Niveles de los transcritos de *Cxcl12* y *Abca1* en la M.O. y número de CFU-C en la sangre de animales WT tratados con vehículo control (PBS-DMSO) o con el agonista de LXR, GW3965. N=5 ratones. E) Número de CFU-C en la sangre y niveles de CXCL12 en M.O. de animales WT y ratones deficientes para los receptores LXR (LXRdKO) tras la inyección de 10^6 neutrófilos. Las muestras fueron analizadas a ZT1. N=7-9 ratones.

Para determinar si la activación de los receptores LXR era suficiente para inducir la reducción en la actividad del nicho hematopoyético y promover la movilización de progenitores a sangre se trataron animales WT con el agonista sintético de LXR, GW3965 (201). Este tratamiento resultó en la reducción de los niveles de expresión de *Cxcl12* y el aumento esperado de los niveles de expresión de *Abca1*. En consonancia con estos cambios, observa-

mos un aumento del número de progenitores en sangre a ZT1 (8 am) que era similar al producido por transferencia de neutrófilos envejecidos (Figura 17D). A continuación, con el fin de confirmar el requerimiento de los receptores LXR en el efecto modulador inducido por neutrófilos en nicho, inyectamos neutrófilos envejecidos en ratones LXRdKO. La transferencia de neutrófilos envejecidos en estos animales no resultó en cambios en los niveles de CFU-C en sangre ni en alteraciones en los niveles de CXCL12 en médula (Figura 17E). Como control, determinamos que la ausencia de estos receptores no afectaba la respuesta esperada a la eliminación de macrófagos, indicando que la ausencia de respuesta a neutrófilos no estaba relacionada con defectos generales de la médula ósea (Figura 17F y 149). Sin embargo, durante el análisis de estos

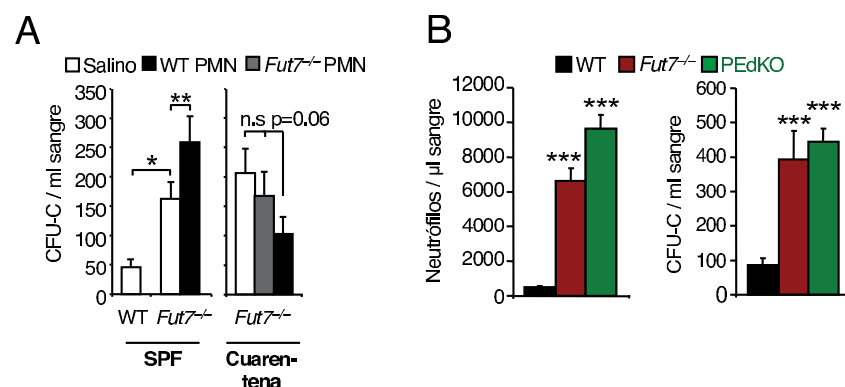


Figura 18. Evidencia de que el nicho hematopoyético es sensible a la exposición a patógenos.

A) Niveles de CFU-C en la sangre de animales WT y *Fut7*^{-/-} control inyectados con 10^6 WT PMN alojados en SPF (*specific pathogen-free*) o en cuarentena. Neutrófilos deficientes en *Fut7* se inyectaron en animales *Fut7* como control adicional. N=3-8 ratones por grupo.

experimentos constatamos niveles basales elevados de progenitores en la sangre de estos animales, poniendo en cuestión si animales con una distribución anormal de los niveles de CFU-C podrían ser refractarios a la modulación por eliminación de neutrófilos. Para examinar esta posibilidad, inyectamos neutrófilos WT en animales *Fut7*^{-/-} que presentan unos niveles basales de CFU-C similares a ratones LXRdKO. Encontramos un aumento aún mayor de los niveles de progenitores en sangre (Figura 18), lo cual sugiere que la falta de respuesta en los animales LXRdKO podría deberse a la ausencia de señalización que ocurre como consecuencia de la activación de estos receptores.

Para circunscribir la actividad fagocítica en macrófagos a la activación de receptores nucleares LXR en estas células, cuantificamos los niveles de expresión de *Abca1* en macrófagos y se observó que la expresión en esta población era superior al compararla con la expresión en múltiples poblaciones de médula ósea analizadas (Figura 19A). Además, mediante experimentos con animales en parabiosis pudimos comprobar que en la población de macrófagos que fagocita neutrófilos los niveles de expresión de *Abca1* y *Mertk* aumentan sig-

nificativamente con respecto a la población no fagocítica (Figura 19B). Por el contrario, la eliminación de neutrófilos en ratones WT resultó en reducciones dramáticas en la expresión de ambos genes en macrófagos (Figura 19C).

En conjunto, estos resultados demuestran un papel esencial de macrófagos y receptores nucleares LXR en la modulación del nicho hematopoyético durante la eliminación de neutrófilos.

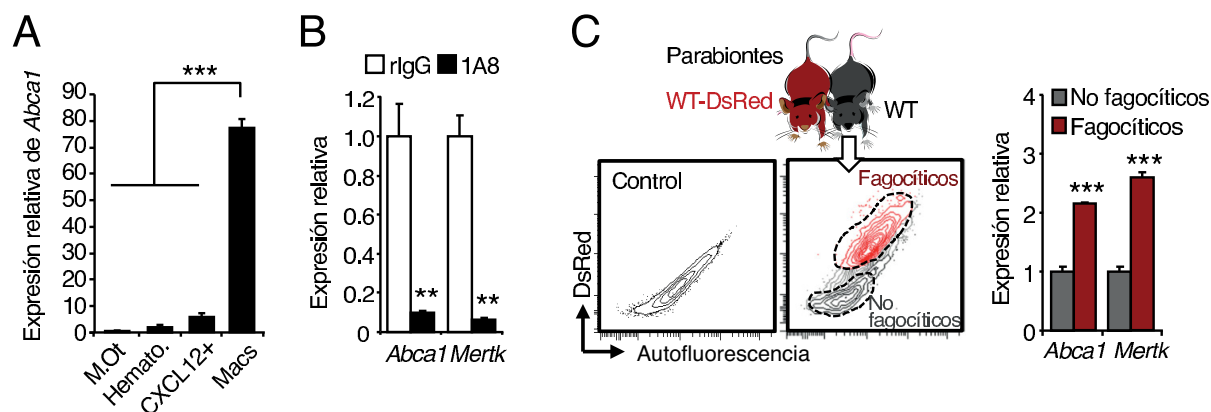


Figura 19: Cambios en la expresión génica de *Cxcl12* y genes diana de receptores LXR regulados por neutrófilos. **A)** Análisis de la expresión relativa de *Abca1* en poblaciones de M.O. M.O total (M.O.t), células hematopoiéticas (LSK y PMN), células productoras de CXCL12 y macrófagos. Muestras procedentes de 4 experimentos. **B)** Expresión de *Abca1* y *Mertk* en macrófagos de M.O purificados mediante sorting de muestras control (rlgG) o animales cuyos neutrófilos han sido eliminados con anti-Ly6G (1A8). N=3 ratones por grupo. **C)** Estrategia para la purificación de macrófagos fagocíticos o no fagocíticos $Gr1^{NEG}F4/80^{+}$ procedentes de la M.O de ratones WT en parabiosis con animales WT *Tg-DsRed*. Expresión de *Abca1* y *Mertk* en macrófagos de M.O que fagocitan o no células sanguíneas procedentes del ratón *Tg-DsRed*. N=3 parejas por grupo.

2.3 Eliminación de neutrófilos envejecidos en médula ósea y regulación del tráfico de progenitores hematopoyéticos.

A continuación investigamos el contexto en el que la eliminación de neutrófilos en circulación y la consiguiente modulación del nicho hematopoyético tendrían un impacto fisiológico.

Nuestros experimentos de transferencia o eliminación de neutrófilos revelaron alteraciones en la actividad de nicho (niveles de progenitores en sangre y número de células CAR y de CXCL12 en médula ósea). Estudios clásicos y recientes han descrito oscilaciones rítmicas en el número de HSPC en sangre que están controladas por señales del sistema nervioso simpático (93, 138, 147). En apoyo a esta hipótesis, existen antecedentes que demuestran que la oscilación natural de los niveles de CXCL12 se relaciona con las fluctuaciones circadianas de HSPC al torrente circulatorio (93). Por este motivo especulamos que estos cambios naturales en la distribución de progenitores hematopoyéticos podrían estar relacionados con la eliminación fisiológica de neutrófilos.

En nuestros experimentos observamos que la desaparición de neutrófilos de

sangre precede aproximadamente 8 horas la elevación de progenitores en circulación (Figura 20A). Para conectar causalmente la eliminación de neutrófilos con las fluctuaciones homeostáticas en nicho y la movilización de progenitores al torrente sanguíneo, interferimos los mediadores celulares y moleculares activados durante este proceso y medimos cómo esto afectaba la ritmicidad de los niveles de HSPC en circulación. Cuantificamos en primer lugar cambios en la transcripción en genes diana de LXR en médula ósea y HSPC en circulación de ratones en los que habíamos eliminado macrófagos o neutrófilos. La eliminación de cualquiera de estos tipos celulares atenuó de manera dramática las fluctuaciones circadianas de *Abca1* en médula ósea y los ritmos de progenitores hematopoyéticos en sangre (Figura 20B).

Estos resultados revelan que la eliminación fisiológica de neutrófilos es necesaria para el mantenimiento de las fluctuaciones circadianas en el nicho hematopoyético y en consecuencia, la movilización rítmica de progenitores a circulación. En la (Figura 21) se resumen los dos primeros bloques de resultados.

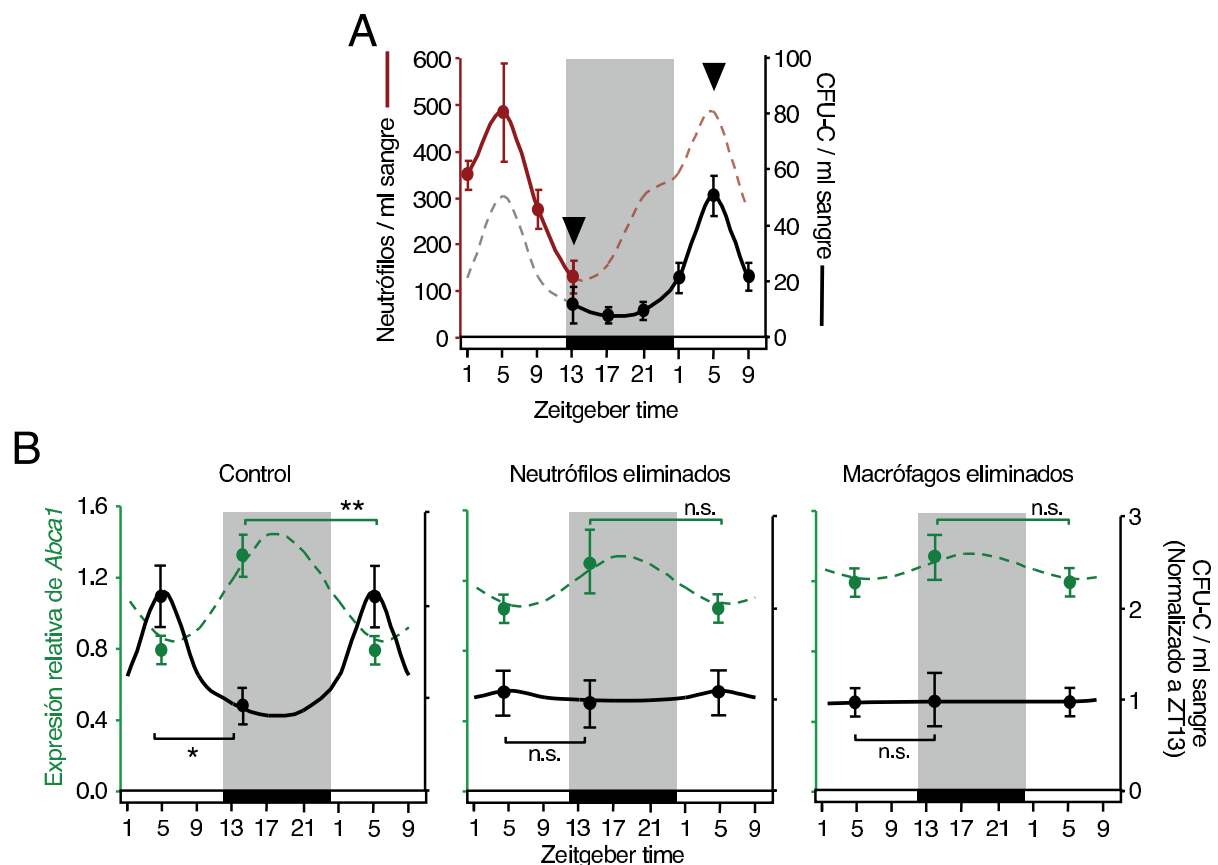


Figura 20: La eliminación de neutrófilos modula la actividad circadiana del nicho hematopoyético y el tráfico de progenitores. **A)** Oscilaciones circadianas en el número de neutrófilos y CFU-C en la sangre de animales WT. Las cabezas de flecha indican los niveles máximos y mínimos utilizados como referencia en las anteriores figuras. **B)** Oscilaciones diarias en los niveles de progenitores hematopoyéticos en sangre (en negro) y niveles relativos de expresión de *Abca1* (en verde) en la M.O a ZT5 y ZT13 de animales control, animales cuyos PMN han sido eliminados con anti-Ly6G (1A8), o animales donde los macrófagos han sido eliminados (clodronato). Las líneas representan las fluctuaciones circadianas de ambos parámetros durante un periodo de 29 horas. N=5-14 ratones.

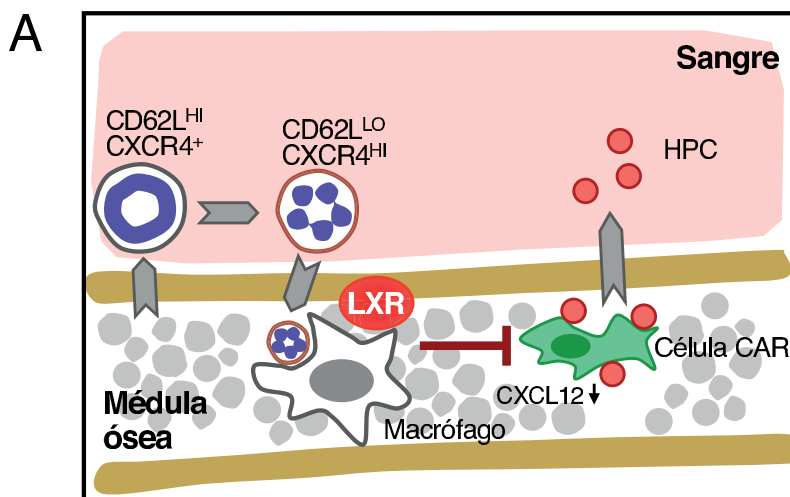


Figura 21: Resumen bloque 1 y 2 de Resultados.

A) Esquema que resume la secuencia de los eventos que hemos identificado. Los neutrófilos $CD62L^{HI}$ abandonan la M.O y entran en circulación. A medida que envejecen se transforman progresivamente en neutrófilos $CD62L^{LO}CXCR4^{HI}$. En momentos específicos del día, los neutrófilos $CD62L^{LO}$ regresan a M.O donde son fagocitados por macrófagos. Los receptores LXR son necesarios para la reducción de la capacidad retentiva del nicho hematopoyético y la movilización fisiológica de HPC a sangre. Estos eventos ocurren de forma sincronizada durante un periodo de 24 horas de duración.

3) Eliminación de neutrófilos en periferia y regulación remota del nicho hematopoyético.

Hasta ahora hemos considerado la eliminación fisiológica de la población $CD62L^{LO}$ de neutrófilos envejecidos en médula ósea y las consecuencias funcionales en este tejido particular. Aparte de médula ósea, varios estudios han identificado el bazo y el hígado como otros órganos en los que se produce la eliminación fisiológica de neutrófilos. Sin embargo estos estudios presentan varios problemas; por ejemplo la manipulación y la consiguiente alteración y activación de los neutrófilos altera su estado basal y favorece su eliminación hacia determinados órganos (106). Por otro lado, la observación de que el clearance de neutrófilos regula la actividad de la médula ósea nos impulsó a caracterizar mejor este proceso en otros tejidos.

3.1 Clearance de neutrófilos en periferia

Para caracterizar el proceso de eliminación de neutrófilos y demostrar si es un proceso pasivo o está guiado por receptores específicos, en primer lugar analizamos el clearance de neutrófilos en animales WT. Para ello utilizamos ratones reporteros $LysM^{Gfp}$ cuya expresión de la proteína GFP permite la detección de células pertenecientes al linaje mieloide y particularmente neutrófilos, por sus niveles de expresión de GFP más elevados en estos leucocitos que en otros linajes (202). La combinación de marcadores específicos de cé-

lulas de origen hematopoyético (CD45) y de neutrófilos (Ly6G) nos permitió analizar 9 tejidos por citometría de flujo. Este abordaje permitió la detección de neutrófilos prácticamente en la totalidad de los órganos analizados, siendo mayoritarios en órganos y tejidos como la médula ósea (40% de las células CD45+), la sangre (10%), el pulmón (8%) y el músculo esquelético (6%) (Figura 22A y B). No se encontraron neutrófilos en cerebro y ovarios.

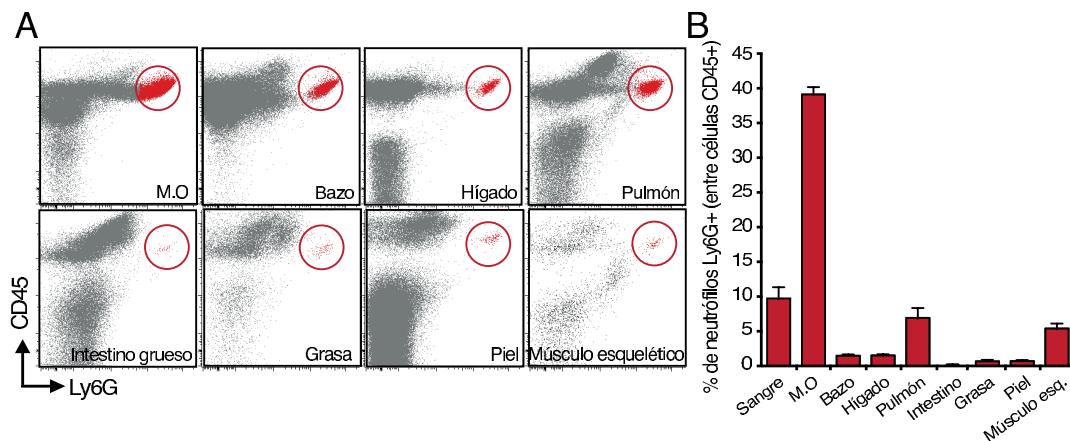


Figura 22: El clearance de neutrófilos es multiorgánico.

A) Análisis mediante citometría de flujo de neutrófilos de animales WT *LysM^{Gfp}* presentes en tejidos (izquierda). Los tejidos fueron digeridos e incubados con anticuerpos fluorescentes para la detección de células de origen hematopoyético (CD45+) y neutrófilos (Ly6G). El círculo rojo indica la población de neutrófilos en los tejidos analizados. B) Cuantificación de neutrófilos en los tejidos mostrados en A). N=3-5 ratones por tejido.

Contrariamente a la idea establecida de que los neutrófilos solo infiltran tejidos inflamados, estos resultados demuestran la presencia de neutrófilos en múltiples órganos en condiciones basales.

El abordaje anterior no permite sin embargo la discriminación entre neutrófilos procedentes de sangre en proceso de eliminación y aquellos que se producen o persisten en estos tejidos. Tal es el caso de órganos como la médula ósea, el pulmón, el hígado y el bazo, tejidos que han sido descritos como órganos granulopoiéticos o reservorios de estas células en condiciones basales (97, 107). Por este motivo, elaboramos otra aproximación para la detección exclusiva de neutrófilos procedentes de sangre. Establecimos parejas de parabiontes entre animales WT y ratones *LysM^{Gfp}* o animales *Tg-DsRed*, lo que permitió identificar neutrófilos GFP+/DsRed+ procedentes de la circulación de aquellos residentes o producidos en tejidos de la pareja WT (cuyos neutrófilos no son fluorescentes). Mediante citometría de flujo analizamos el porcentaje de neutrófilos fluorescentes en cada tejido (Figura 23A). A continuación, analizamos por microscopia de fluorescencia la presencia y la distribución de neutrófilos en secciones de tejidos combinando la fluorescencia GFP con el marcador específico de neutrófilos Ly6G (Figura 23B). Ambas aproximaciones dieron resultados similares y en concordancia con los datos obtenidos previamente, y demostraron que la eliminación de neutrófilos ocurre en médula ósea,

pulmón, intestino grueso, hígado, músculo esquelético, piel, bazo y tejido adiposo blanco (grasa epididimal).

Curiosamente y en relación con los datos obtenidos previamente en médula ósea (Figura 15A y B) los neutrófilos se localizan en regiones específicas dentro de los órganos (Figura 23B). En el caso del bazo, los neutrófilos se localizan

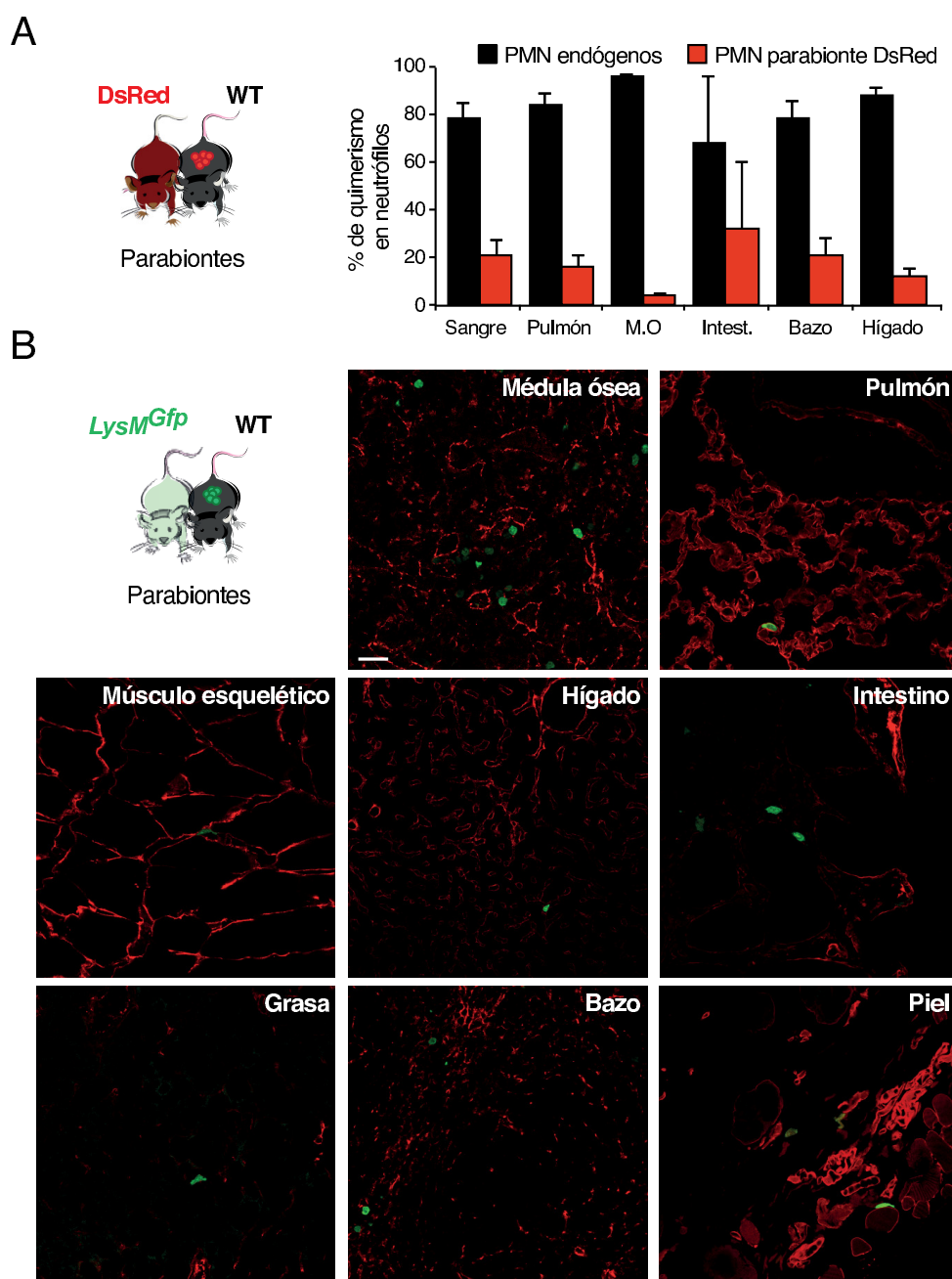


Figura 23: Clearance de neutrófilos de circulación.

A) Esquema y cuantificación del porcentaje de neutrófilos endógenos (WT) y procedentes del compañero (WT *Tg-DsRed*) un mes después de la cirugía. El porcentaje de quimerismo aparece representado en barras para los distintos órganos analizados. B) Inmunofluorescencias de tejidos en parabiontes WT *LysM^{Gfp}*, que permiten la detección de neutrófilos (verde) en el animal WT no fluorescente. Las imágenes son representativas de 3 parejas de parabiontes analizadas. Escala= 25 µm

en la zona marginal en la cual abundan macrófagos CD169⁺, lo que sugiere un tropismo específico hacia estas regiones. Es importante mencionar que durante la realización de estos experimentos los animales fueron perfundi-

dos para evitar contaminación con células presentes en los vasos sanguíneos. Igualmente realizamos controles adicionales para demostrar que los neutrófilos intravasculares no contribuían de manera significativa en nuestras cuantificaciones.

En resumen, estos análisis demuestran que la eliminación fisiológica de neutrófilos es multiorgánica y no se restringe de manera exclusiva a médula ósea, bazo e hígado.

3.2 Desregulación del tráfico de progenitores hematopoyéticos en animales con tráfico deficiente de neutrófilos.

La ausencia de *Fut7* se ha relacionado con un aumento significativo del número de neutrófilos en sangre (196). Estudios de microscopía intravital en piel y músculo cremáster en ratones *Fut7*^{-/-} han demostrado que el rolling dependiente de selectinas P y E está drásticamente reducido en estos tejidos (196). Este defecto en la migración de neutrófilos también se da en animales PEdKO, cuya neutrofilia es incluso más elevada que en animales *Fut7*^{-/-} (195) y (Figura 24). Estos resultados coinciden con estudios previos que demuestran la importancia de la migración efectiva de leucocitos para mantener niveles de leucocitos homeostáticos en circulación (189). Usando ensayos clonogénicos encontramos que los animales *Fut7*^{-/-} y los PEdKO tienen además en común la presencia de un elevado número de progenitores hematopoyéticos en sangre (Figura 24). Decidimos por tanto estudiar la posible relación entre los fenotipos inmune y hematopoyético en animales *Fut7*^{-/-}.

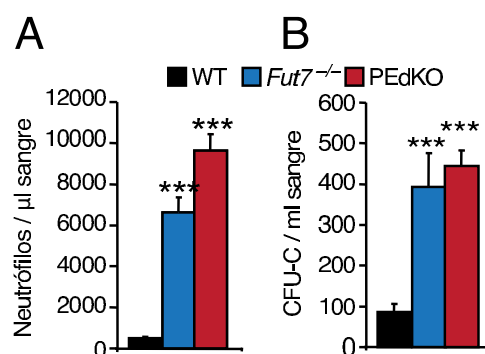


Figura 24: Los niveles de neutrófilos en circulación correlacionan con un número elevado de progenitores en sangre.

A) Neutrófilos en sangre de animales WT, *Fut7*^{-/-} y PEdKO en muestras de sangre analizadas a ZT5. B) Niveles de CFU-C en sangre en los mismos animales mostrados en A). N=6-20 ratones por grupo.

Para establecer una relación causal entre el tráfico anormal de neutrófilos y los niveles alterados de progenitores en sangre periférica, transferimos en primer lugar neutrófilos WT envejecidos *ex vivo* en ratones *Fut7*^{-/-} y 18 horas después, medimos el número de progenitores en sangre. Este simple

tratamiento indujo una marcada reducción en el número de progenitores circulantes (Figura 18), sugiriendo que la eliminación correcta de neutrófilos en tejidos es capaz de regular el tráfico de HSPC. Es importante destacar que este efecto se observó en animales estabulados en condiciones de cuarentena durante la realización de este experimento. Como control, la transferencia de neutrófilos deficientes en *Fut7* no produjo cambios en los niveles de progenitores ni alteraciones de CXCL12 en médula ósea. Estos datos entran en conflicto aparente con los resultados expuestos anteriormente, los cuales mostraban que la transferencia de neutrófilos inducía un incremento de HSPC en circulación en ratones WT en animales alojados en una habitación libre de patógenos (Figura 18). Para explicar estos resultados discordantes y entender el origen del defecto hematopoyético en ausencia de tráfico de neutrófilos, procedimos a caracterizar en detalle la eliminación de neutrófilos en el modelo *Fut7*^{-/-}.

3.3 Control remoto del nicho hematopoyético en periferia.

La observación de que la transferencia de neutrófilos normaliza los niveles de progenitores en sangre y de CXCL12 en médula ósea en ratones *Fut7*^{-/-} (Figura 18) sugería que la presencia de ligandos funcionales de selectinas en neutrófilos es necesaria para mantener los niveles homeostáticos de progenitores hematopoyéticos. En vista del clearance multiorgánico observado en animales WT en parabiosis, especulamos que la modulación de los niveles de progenitores hematopoyéticos podría estar relacionada con la eliminación de neutrófilos en tejidos periféricos (es decir, fuera de la médula ósea).

Para validar esta hipótesis realizamos nuevos experimentos de parabiosis. Esta aproximación tiene la ventaja adicional de estudiar el efecto de la exposición crónica a neutrófilos WT en ratones *Fut7*^{-/-} sin necesidad de purificar o manipular estas células. Para ello conectamos la circulación de ratones *Fut7*^{-/-} que expresan el transgén DsRed (*Fut7*^{-/-} DsRed para discriminarlos de las células de la pareja en parabiosis) con animales *Fut7*^{-/-} o con ratones neutropénicos (*Mcl1*^{fl/fl} *hMRP8-Gfp*^{Cre}) como grupos control. Los demás grupos experimentales sujetos a parabiosis fueron *Fut7*^{-/-} con ratones WT, con mutantes en los que la migración de neutrófilos está impedida a médula ósea (NR4), o mutantes con deficiencias en migración a ciertos tejidos periféricos (ratones deficientes en el receptor CXCR2 o las integrinas $\beta 2$ /CD18). En estos experimentos observamos una reducción significativa en el número de progenitores hematopoyéticos en sangre cuando los ratones *Fut7*^{-/-} se encontraban expuestos a sangre WT o deficientes en el receptor de migración

a médula ósea, CXCR4 (Figura 25A y B). Sin embargo, esta reducción no se observó en animales neutropénicos, indicando que el efecto estaba mediado exclusivamente por neutrófilos. Tampoco se corrigieron los niveles de HSPC en presencia de sangre de animales con potenciales defectos en migración a periferia (*Cxcr2*^{-/-} y *CD18*^{-/-}). La corrección en la actividad del nicho hematopoyético de animales *Fut7*^{-/-} expuestos a sangre WT resultó además en un aumento significativo en los niveles de CXCL12 en médula ósea (Figura 25C).

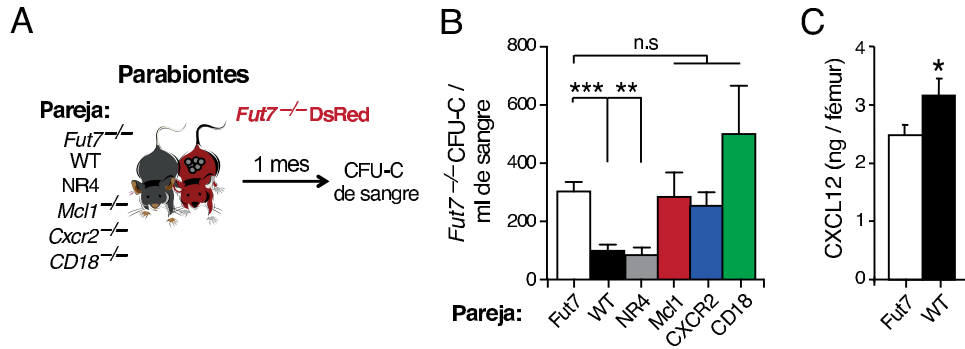


Figura 25: Control periférico del nicho hematopoyético y tráfico de progenitores.

A) Esquema de las parejas en parabiosis con animales *Fut7*^{-/-}-*Tg-DsRed*: control *Fut7*^{-/-}, WT, NR4, *Mcl1*^{-/-}, *Cxcr2*^{-/-} y *CD18*^{-/-}. Mediante la expresión del transgén DsRed en animales *Fut7*^{-/-} podemos discriminar las CFU-C endógenas (DsRed⁺) y las procedentes del parabionte pareja (DsRed^{NEG}). B) Niveles de CFU-C en los parabiontes de los grupos reflejados en A). C) Niveles de CXCL12 en la M.O. de animales parabiontes *Fut7*^{-/-} que comparten circulación con animales control *Fut7*^{-/-} o con WT. N=5-20 ratones por grupo.

Estos resultados sugieren que la eliminación de neutrófilos en tejidos periféricos constituye un mecanismo adicional de control de la actividad del nicho hematopoyético que permite mantener niveles homeostáticos de progenitores hematopoyéticos en sangre.

Para identificar el posible tejido o tejidos en los que la infiltración de neutrófilos es relevante para la corrección del defecto hematopoyético, procedimos a analizar el clearance de neutrófilos en el modelo de parabiosis con ratones *Fut7*^{-/-}. Mediante citometría de flujo, comparamos la presencia de neutrófilos procedentes del animal pareja en parabiosis (*Fut7*^{-/-}, WT, *Cxcr2*^{-/-}, *CD18*^{-/-}, NR4 o *Mcl1*^{ff} *hMRP8-Gfp*^{Cre}) en médula ósea, bazo, hígado, pulmón, grasa epididimal, intestino grueso (colon), músculo esquelético y piel de los ratones *Fut7*^{-/-}. De esta forma, comprobamos que los neutrófilos deficientes en *Fut7* tienen un defecto específico de eliminación en piel e intestino en condiciones homeostáticas (Figura 26A). Concretamente, en las parejas de parabiontes en los que se corrigen los niveles de HSPC (WT y NR4) se apreció una acumulación de neutrófilos WT o NR4 en piel, indicando que éste podría ser un órgano diana donde los neutrófilos regulan la actividad del nicho hematopoyético. En estos grupos observamos además acumulación de neutrófilos en músculo esquelético e intestino, indicando también una posible contribución de estos órganos en la regulación del tráfico de HSPC (Figura 26B).

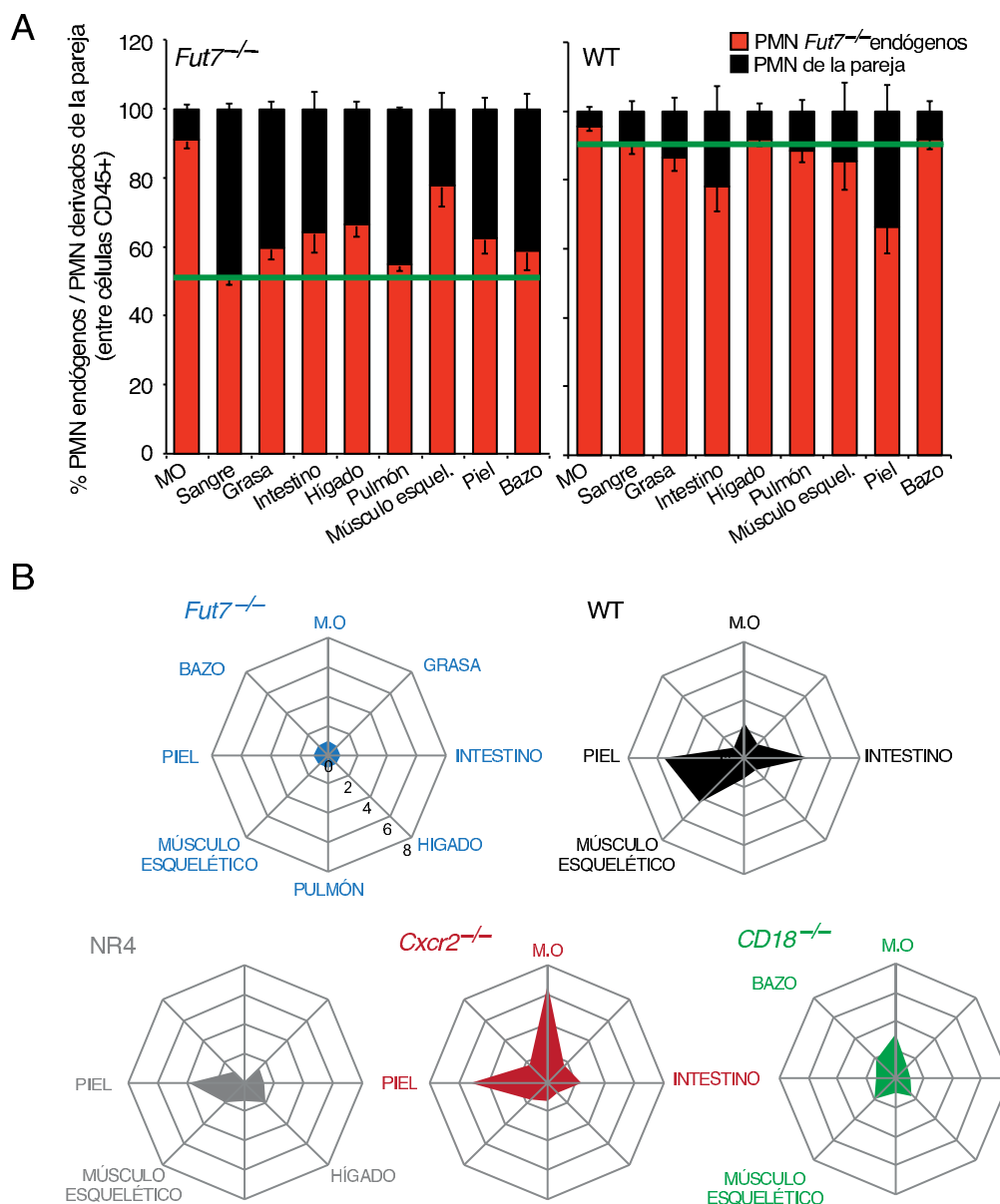


Figura 26: Clearance de neutrófilos en parabiontes *Fut7*^{-/-}

A) Porcentaje de neutrófilos Ly6G⁺ endógenos (en rojo) y procedentes de la pareja (en negro) en parabiontes control *Fut7*^{-/-} *Fut7*^{-/-} y en parabiontes *Fut7*^{-/-} WT, en los tejidos analizados. La línea verde indica los porcentajes esperados con respecto a sangre. Los neutrófilos *Fut7*^{-/-} presentan defectos en el clearance en intestino y piel. B) Representación con gráficos radiales de la migración de neutrófilos WT, NR4, *Cxcr2*^{-/-} y *CD18*^{-/-} comparados con neutrófilos *Fut7*^{-/-}, en tejidos de parabiontes *Fut7*^{-/-}. N=4-5 ratones por genotipo y tejido.

Para correlacionar los resultados de clearance con mecanismos de eliminación activa o fagocitosis examinamos la captura de células fluorescentes por macrófagos tisulares de la pareja no fluorescente. En estos experimentos se aislaron macrófagos de animales *Fut7*^{-/-} en los distintos tejidos y se analizó el porcentaje de macrófagos fagocíticos mediante la aparición de señal DsRed en estas células. Encontramos que las poblaciones de macrófagos más fagocíticas eran las de médula ósea, bazo, e hígado, resultados que están de acuerdo con estudios previos (110) (Figura 27B). A pesar del clearance preferencial de neutrófilos en músculo esquelético y en piel en parabiontes *Fut7*^{-/-}, no se detectaron macrófagos fagocíticos en estos tejidos. Sorprendentemente, los macrófagos de intestino fagocitan eficientemente células fluorescentes (Figura

27A y B). Estos resultados sugieren que la acumulación neta de neutrófilos observada en piel y músculo esquelético no está relacionada necesariamente con procesos fagocíticos y revelan que el intestino grueso participa activamente en la eliminación de estas células.

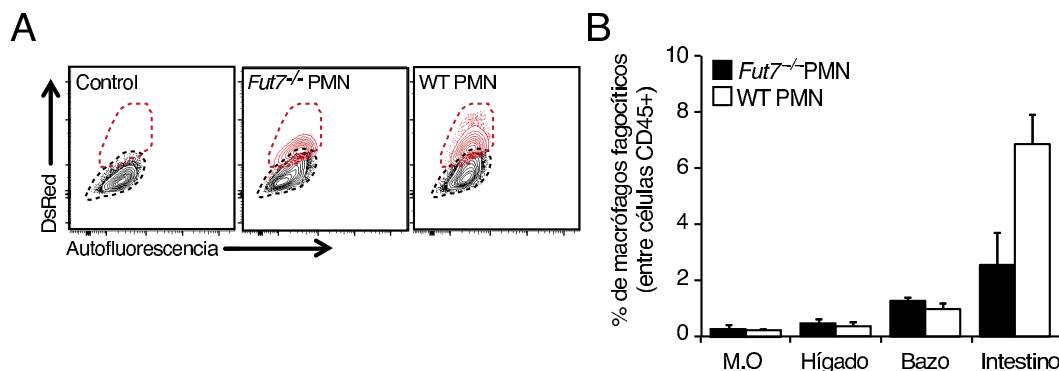


Figura 27: Fagocitosis de neutrófilos WT en el intestino de ratones *Fut7*^{-/-}

A) Gráficos de densidad de citometría de flujo mostrando las poblaciones de macrófagos de intestino grueso (colon) CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ de parabiontes *Fut7*^{-/-} conectados a la circulación de animales control ratones *Fut7*^{-/-} *Tg-DsRed* o WT *Tg-DsRed*. El eje X muestra la autofluorescencia característica para estas células en el canal FITC. La línea de puntos negra delimita la población no fagocítica (DsRed^{NEG}), mientras que la roja indica los macrófagos que han fagocitado células rojas (DsRed⁺). Se incluye un control WT sin parabiosis para identificar las poblaciones fagocíticas. B) Cuantificación de macrófagos fagocíticos en parabiontes *Fut7*^{-/-} conectados a animales control *Fut7*^{-/-} *Tg-DsRed* o WT *Tg-DsRed*. Los neutrófilos WT son fagocitados preferencialmente en el intestino de animales *Fut7*^{-/-}. Datos procedentes de 2 experimentos independientes con 3-5 parejas analizadas por órgano.

Para estudiar si los resultados anteriores excluyen el papel de macrófagos en la eliminación de neutrófilos en periferia y por tanto, en la regulación remota del nicho hematopoyético, realizamos nuevos ensayos en parejas parabióticas de ratones *Fut7*^{-/-} con ratones WT *Tg-DsRed*. En estos experimentos eliminamos con liposomas de clodronato inyectados por vía intravenosa los macrófagos residentes en hígado, bazo y médula ósea, mientras que macrófagos residentes de otros tejidos no se vieron afectados durante el tratamiento. La eliminación de macrófagos en estos tejidos no previno la corrección de los niveles de progenitores en sangre observada previamente (Figura 28), indicando que los macrófagos de estos órganos no son las responsables del efecto regulador de progenitores hematopoyéticos de neutrófilos WT en animales *Fut7*^{-/-}.

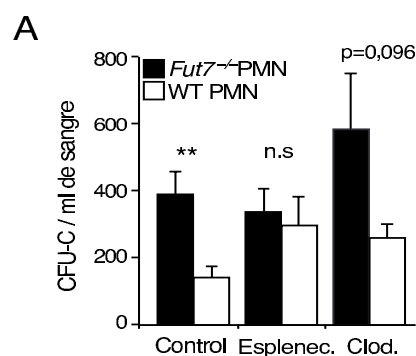


Figura 28: El bazo controla los niveles de HSPC en periferia.

A) Niveles de CFU-C en la sangre de parabiontes *Fut7*^{-/-} conectados a la circulación de animales *Fut7*^{-/-} o WT *Tg-DsRed* como grupo control, esplenectomizados, o inyectados con clodronato (100 μ l i.v en el animal *Fut7*^{-/-}) 5 días antes del análisis de CFU-C.

Por otro lado, el bazo ha sido identificado como uno de los órganos en los que preferencialmente tiene lugar la eliminación de neutrófilos (107). En el bazo además existe hematopoyesis residual en ratones adultos y por tanto, sirve de reservorio para HSPC (118). Para comprobar si el bazo es requerido para la corrección del fenotipo hematopoyético de ratones *Fut7*^{-/-} realizamos experimentos de parabiosis en los que el bazo del ratón parabionte *Fut7*^{-/-} fue eliminado quirúrgicamente (Figura 29). En estos experimentos la presencia de sangre WT no corrigió los niveles de HSPC, indicando que el bazo está implicado en la modulación periférica de HSPC.

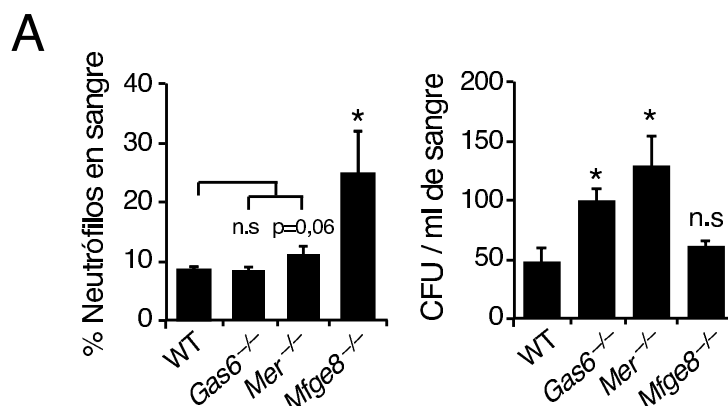


Figura 29: Acumulación de neutrófilos y HSPC en sangre de ratones deficientes para la eliminación de células apoptóticas.

A) Porcentaje de neutrófilos en la sangre de ratones WT, *Gas6*^{-/-}, *Mer*^{-/-} y *Mfge8*^{-/-}. B) Niveles de CFU-C en sangre de los animales mostrados en A). N=3-6 ratones por grupo.

Finalmente con el fin de analizar el mecanismo molecular por el cual los neutrófilos son fagocitados y comprobar si este proceso es requerido para la corrección del nicho hematopoyético *Fut7*^{-/-}, estamos generando ratones deficientes para MFGE8 (del inglés, *milk fat globule-EGF 8*) en fondo genético *Fut7*^{-/-}. MFGE8 es una “molécula puente” necesaria para el reconocimiento de la fosfatidilserina presente en la membrana de células en apoptosis. Ratones deficientes en MFGE8 y en otras moléculas implicadas en la fagocitosis de neutrófilos (como GAS6 ó MERTK) presentan neutrofilia (20) y niveles de progenitores hematopoyéticos en circulación elevados (Figura 29), lo que sugiere que la desregulación del proceso de eliminación de neutrófilos está relacionada con alteraciones en el nicho hematopoyético.

En conclusión, estos resultados demuestran la eliminación ubicua de neutrófilos en el organismo. Los resultados recogidos hasta el momento indican que la eliminación de neutrófilos en el intestino, el músculo esquelético o la piel podría ser responsable de la corrección de los niveles homeostáticos de HSPC y que el bazo es requerido para la modulación de los niveles de HSPC. La identificación de poblaciones celulares fagocíticas y mediadores moleculares (MFGE8, GAS6 o MERTK) será esencial para entender cómo se regula el tráfico de células madre hematopoyéticas en mamíferos.

3.4 Modulación de nichos hematopoyéticos periféricos.

En el primer bloque de resultados hemos observado que la respuesta del nicho hematopoyético es dependiente de la eliminación de neutrófilos mediada por macrófagos de médula ósea. Esta regulación se lleva a cabo en los niveles de la quimioquina CXCL12, principalmente producido por células CAR. Estudios previos del laboratorio han puesto en evidencia la existencia de células productoras de CXCL12 de naturaleza endotelial en pulmón, cuya función está íntimamente relacionada con la retención de neutrófilos en este órgano (97).

Con el fin de analizar la existencia de células que producen CXCL12 en periferia como posibles nichos sujetos a modulación por la eliminación de neutrófilos, hemos analizado la presencia de células GFP⁺ en múltiples tejidos de ratones *Cxcl12^{Gfp}* mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia de tejidos. Específicamente estudiamos la presencia de células CXCL12-GFP⁺ en médula ósea, bazo, hígado, pulmón, piel, intestino grueso, músculo esquelético y grasa epididimal. Mediante las dos aproximaciones hemos detectado la presencia de células productoras de CXCL12 en poblaciones de células de endoteliales CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31⁺ y en poblaciones de células estromales CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG} (Figura 30A).

En médula ósea, un tejido bien caracterizado para células productoras de CXCL12, pudimos confirmar la presencia de al menos tres tipos celulares productores de esta quimioquina: endotelio CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31⁺GFP^{LO}, células osteoblásticas CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{LO} y células CAR CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{HI} (Figura 30).

El estudio por inmunofluorescencia de estos tejidos permitió también detectar la localización de estas poblaciones en tejidos extramedulares. Encontramos que en tejidos como el hígado, las células que expresan mayoritariamente CXCL12 son hepatocitos CD31^{NEG} (Figura 30B). En otros tejidos como el intestino grueso la expresión de CXCL12 colocaliza con células CD31⁺ pero una amplia mayoría son CD31^{NEG}.

Estos resultados revelan la existencia de células que producen CXCL12 en múltiples órganos y su presencia sugiere la existencia de nichos modulables en periferia.

Con el fin de estudiar la relevancia de estos resultados en el contexto de nuestro estudio, hemos generado dos líneas de ratones en los que estudiar la modulación de células productoras de CXCL12 en tejidos de periferia por la

eliminación de neutrófilos. La primera línea *Fut7^{-/-} Cxcl12^{Gfp}*, nos permite analizar alteraciones hematopoyéticas en el modelo *Fut7^{-/-}*. La segunda línea *Mcl1^{ff} hMRP8-Gfp^{Cre} Cxcl12^{Gfp}* se generó para estudiar alteraciones en la producción de CXCL12 en ausencia de neutrófilos.

A continuación, analizamos y comparamos los niveles de células productoras de CXCL12 en los tejidos de ratones control *Cxcl12^{Gfp}*, *Fut7^{-/-} Cxcl12^{Gfp}*

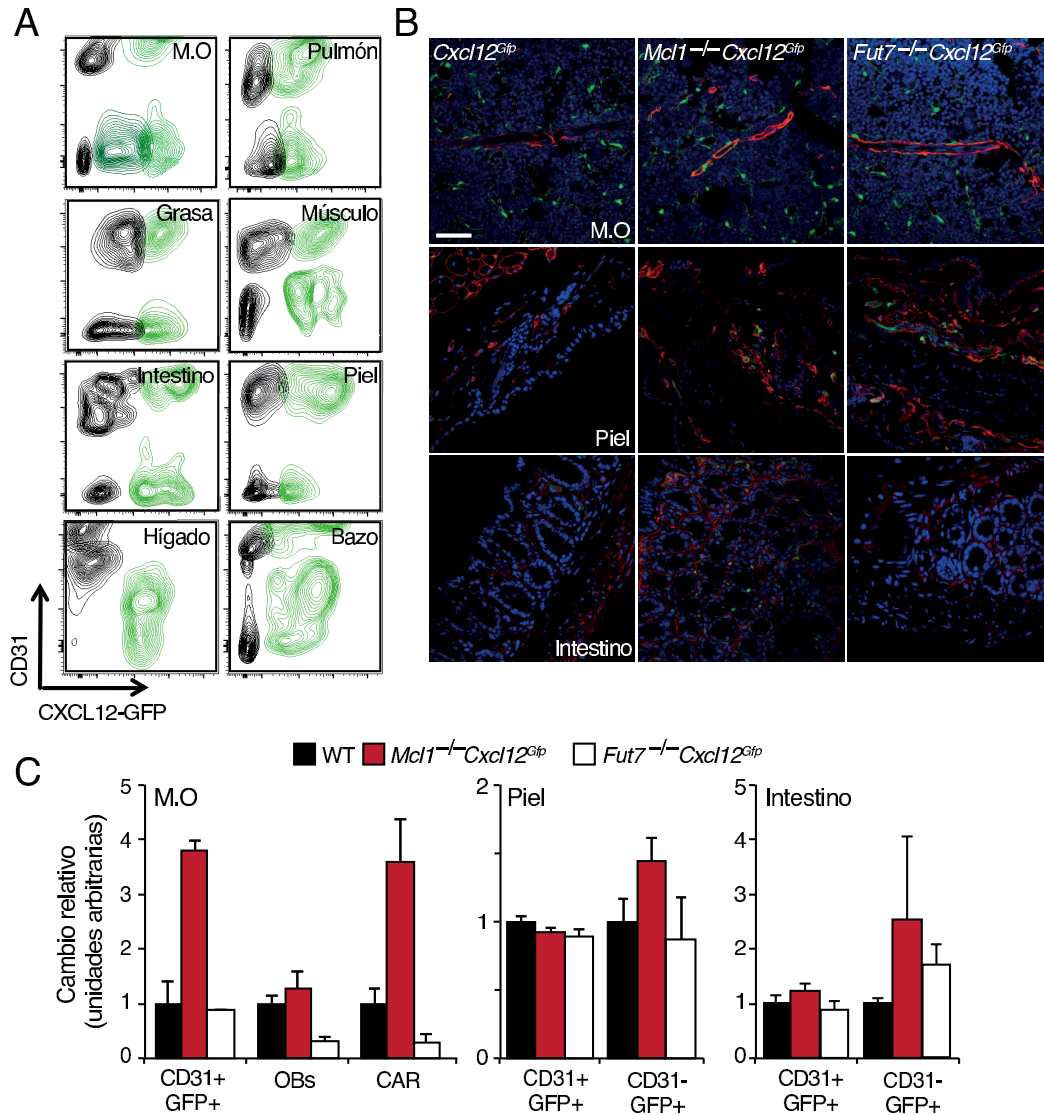


Figura 30: Las células que producen CXCL12 se detectan en tejidos periféricos.

A) Plots representativos de tejidos para identificar células que producen CXCL12 en animales *Cxcl12^{Gfp}*. Esta estrategia permite la detección de células endoteliales (CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31⁺) GFP^{NEG} ó GFP⁺; células CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG} identifican células estromales. La presencia de GFP en esta población indica que el estroma también produce CXCL12 en periferia además de en M.O. B) Inmunofluorescencias de tejidos analizados en A en animales *Cxcl12^{Gfp}*, *Fut7^{-/-} Cxcl12^{Gfp}* y en *Mcl1^{-/-} Cxcl12^{Gfp}*. En rojo, laminina para teñir endotelio. Los núcleos de las células aparecen en azul mediante el marcaje con DAPI. Escala = 50 μ m C) Cuantificación de las poblaciones analizadas en A y B en los distintos mutantes. Ratones neutropénicos y neutrofílicos muestran alteraciones en la distribución de las poblaciones que producen CXCL12 en tejidos periféricos y M.O. N=2 ratones por genotipo y tejido.

y *Mcl1^{ff} hMRP8-Gfp^{Cre} Cxcl12^{Gfp}* (Figura 30B). El análisis por citometría de flujo e histología de estas líneas reveló alteraciones en la frecuencia de células productoras de CXCL12 en médula ósea, intestino y piel, destacando estos

órganos como potenciales dianas periféricas de la modulación de los niveles de CXCL12.

Para determinar la modulación de las células CXCL12-GFP⁺ asociadas a la retención de HSPC en tejidos periféricos generamos parejas parabióticas entre ratones *Fut7*^{-/-} *Cxcl12*^{Gfp} con ratones *Fut7*^{-/-} y *Fut7*^{-/-} *Cxcl12*^{Gfp} con ratones WT. El análisis por citometría de flujo de las células productoras de CXCL12 en periferia no reveló cambios significativos en la frecuencia de estas poblaciones. En este sentido, la variabilidad encontrada durante la preparación de las muestras podría explicar estos resultados.

3.5 Control circadiano del tráfico de progenitores hematopoyéticos.

En vista a los resultados anteriores, planteamos la hipótesis de la existencia de dos mecanismos de eliminación de neutrófilos que regulan la distribución de progenitores hematopoyéticos en el organismo: la médula ósea, en los que la eliminación provoca la movilización espontánea de progenitores a la circulación (Figura 21); y tejidos extramedulares, en los que la eliminación sirve para reducir los niveles de progenitores en periferia.

Como ya describimos en el caso de ratones WT, encontramos que en condiciones basales los ratones *Fut7*^{-/-} y PEdKO presentan niveles de progenitores en sangre que muestran fluctuaciones circadianas intactas (Figura 31A). Estas oscilaciones también se preservan en los niveles de neutrófilos en sangre (Figura 31B). Esta observación resulta sorprendente porque indica independencia de estos ritmos respecto al tráfico de neutrófilos mediado por selectinas. Sin embargo, encontramos que la amplitud de la curva que describe las fluctuaciones a ZT5 y ZT13 estaban incrementadas entre 8-10 veces en ratones *Fut7*^{-/-} y PEdKO con respecto a animales WT (Figura 31A). En base a estas observaciones y la modulación de células CXCL12-GFP⁺ en tejidos de periferia mostrada anteriormente, buscamos relacionar la eliminación periférica de neutrófilos con las oscilaciones naturales de progenitores hematopoyéticos.

En condiciones basales existen progenitores hematopoyéticos en localizaciones distintas a su reservorio original, la médula ósea (37). Además de circular a través de la sangre y de la linfa, la presencia de HSPC extramedulares se ha demostrado en hígado, bazo, tejido adiposo, músculo, ducto torácico, pulmón y riñón (26, 42, 158, 167-169). En algunos de estos tejidos los progenitores se encuentran asociados a estructuras vasculares similares a las encontradas en el nicho hematopoyético de médula ósea (26).

Con el fin de analizar si las fluctuaciones circadianas en HSPC ocurren sólo en sangre o si existen otros reservorios en otros tejidos sujetos a esta modulación, analizamos la presencia de HSPC en hígado, bazo y médula ósea en

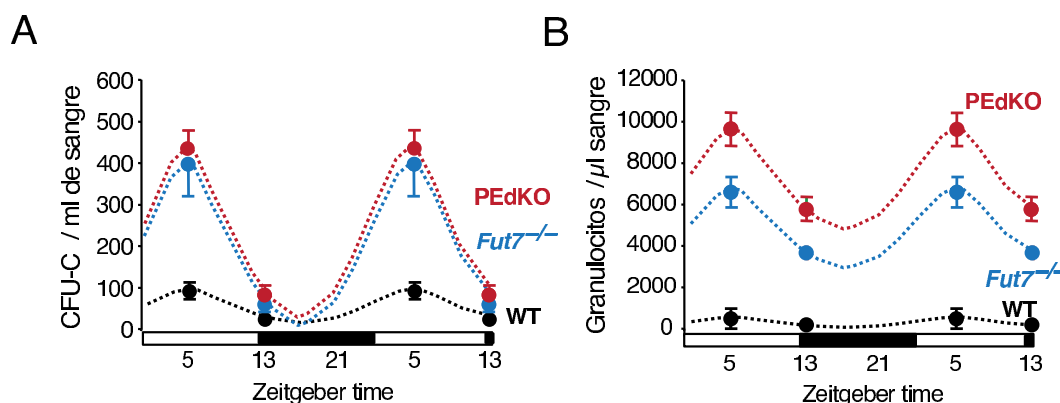


Figura 31: Defectos en el clearance de neutrófilos provoca alteraciones en las oscilaciones circadianas de HSPC.

A) Oscilaciones de CFU-C en la sangre WT, *Fut7*^{-/-} y PEdKO a ZT5 y ZT13. B) Oscilaciones circadianas de neutrófilos en la sangre de los animales mostrados en A. Nótese la oscilación entre ZT5 y ZT13 de ratones con defectos en clearance de neutrófilos, más pronunciada que en animales WT. N=6-20 ratones por genotipo. Las líneas discontinuas trazan la tendencia circadiana de los niveles de neutrófilos y CFU-C en los distintos genotipos en el curso de un día.

animales WT. Observamos que los niveles de progenitores hematopoyéticos fluctúan en todos los órganos analizados con niveles reducidos a ZT13 (Figura 32A). La disminución en los niveles de HSPC residentes en tejidos a ZT13 sugiere que el proceso de clearance de progenitores en circulación es opuesto al observado para neutrófilos y otros leucocitos, cuyos niveles en tejido aumentan a ZT13.

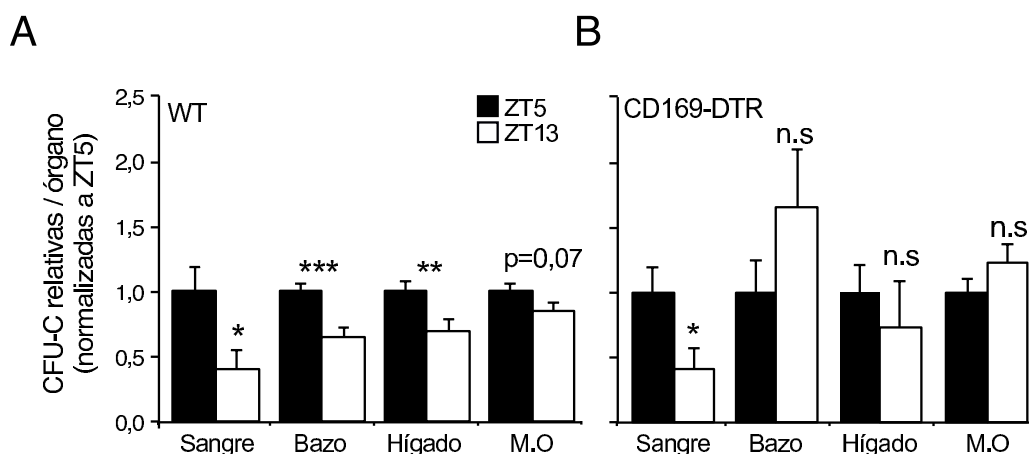


Figura 32: Oscilaciones circadianas de HSPC en órganos periféricos y dependencia de macrófagos CD169⁺.

A) Fluctuaciones de CFU-C en animales WT en sangre, bazo, hígado y M.O. Los valores aparecen normalizados a los valores obtenidos a ZT5. B) Macrófagos CD169⁺ modulan la actividad del nicho hematopoyético en periferia. Niveles de CFU-C en tejidos de animales CD169-DTR cuyos macrófagos de M.O. y bazo han sido eliminados por el tratamiento con toxina diftérica. Las fluctuaciones en sangre de CFU-C se mantienen. N=7 ratones por genotipo y grupo.

La migración de leucocitos en ausencia de inflamación en tejidos extramedulares ha sido recientemente descrita como un mecanismo dependiente de la expresión circadiana de ICAM-1 (del inglés, *intercelular cell adhesión molecule 1*) en endotelio (60). La expresión de los niveles de este receptor fluctúa con los ciclos de luz y oscuridad, siendo máxima su expresión por la noche

(ZT13) en tejidos extramedulares. Para dilucidar el papel de ICAM-1 en el clearance de neutrófilos en tejidos analizamos mediante microscopía intravital su adhesión a la microvasculatura de la piel y del músculo esquelético a distintos tiempos (ZT5 y ZT13) (Figura 33A).

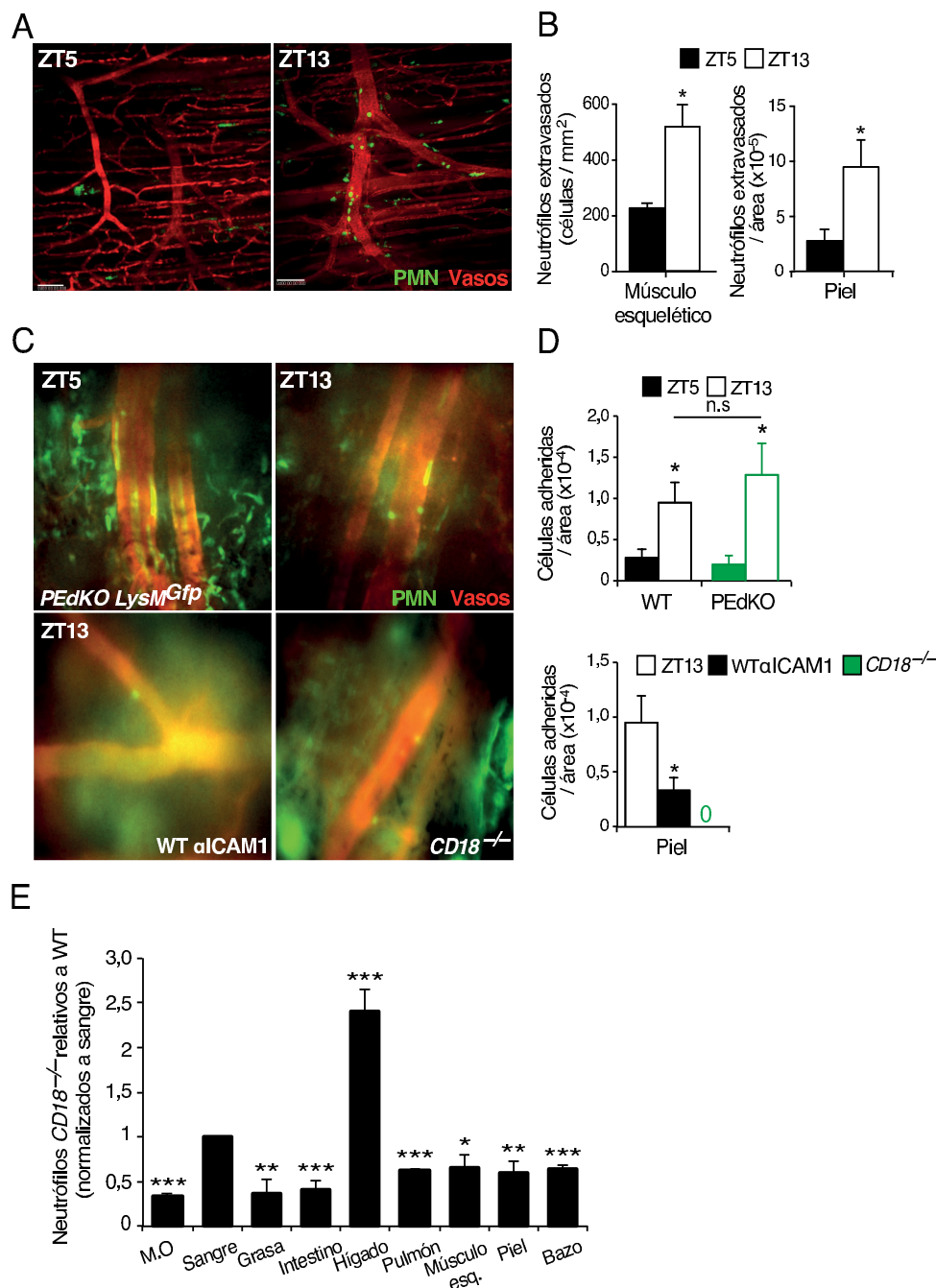


Figura 33: El clearance de neutrófilos de sangre es circadiano y depende del eje ICAM-1-integrinas $\beta 2$.

A) Clearance de neutrófilos circadiano en músculo esquelético. Las imágenes muestran capturas de microscopía intravital multi-fotón del músculo esquelético de ratones *LysM^{Gfp}* a ZT5 y ZT13. El canal verde identifica neutrófilos y el rojo (Evan's blue) vénulas postcapilares. B) Cuantificación del número de neutrófilos extravasados en músculo esquelético y piel a ZT5 y ZT13 representado por área. Las cuantificaciones reflejan la adhesión de neutrófilos durante 35 minutos. N=4-5 ratones por grupo. C) Imágenes de microscopía intravital en piel de ratones PEdKO *LysM^{Gfp}* donde se visualiza la adhesión de neutrófilos (verde) a ZT5 y ZT13 (arriba). En las imágenes de la parte inferior se analizó la adhesión de neutrófilos en ratones WT tratados previamente con anticuerpo α -ICAM1 (izquierda) y la adhesión de neutrófilos en animales *CD18^{-/-}* a ZT13. En ambos casos, los neutrófilos endógenos se visualizaron inyectando anticuerpo anti-Ly6G fluorescente. D) Cuantificación de los neutrófilos adheridos a ZT13 en ratones control WT *LysM^{Gfp}* y en los ratones analizados en C). N=3-4 ratones por grupo y tiempo. E) Análisis del clearance de neutrófilos WT *Tg-DsRed* frente a *CD18^{-/-}* en quimeras de médula ósea de estos animales transplantados en recipientes WT. Los neutrófilos *CD18^{-/-}* se acumulan en hígado y no se eliminan correctamente en el resto de órganos. La cuantificación refleja valores relativos de neutrófilos *CD18^{-/-}* en ratones quimera, 6 semanas después del trasplante de M.O. N=5 ratones.

En estos órganos encontramos un clearance de neutrófilos claramente superior a ZT13 en animales WT y este incremento está parcialmente inhibido al bloquear ICAM-1 (Figura 33B-D). Además, en animales deficientes en integrinas $\beta 2$ ($CD18^{-/-}$), los receptores de ICAM-1, la adhesión al endotelio estaba completamente ausente (Figure 33D). Estos resultados corroboran estudios previos en los que se ha observado una mayor extravasación de leucocitos a ZT13 (60), explican la reducción o clearance de neutrófilos circulantes por la tarde (Figura 5B), y demuestran que es dependiente de ICAM-1.

Con el fin de relacionar los mecanismos de eliminación rítmica en periferia de neutrófilos con el impacto de este proceso en el nicho hematopoyético, inhibimos ICAM-1 in vivo mediante inyección de un anticuerpo bloqueante en animales WT, $Fut7^{-/-}$ y PEdKO. Este tratamiento resultó en un aumento en el número de neutrófilos en circulación a ZT13 en animales de los 3 genotipos (Figura 34A), indicando un bloqueo eficiente del clearance espontáneo de neutrófilos. Observamos además que el bloqueo de ICAM-1 disminuía marcadamente la amplitud de las fluctuaciones de HSPC previamente observadas en animales $Fut7^{-/-}$ y PEdKO. En experimentos control comprobamos que el tratamiento con el anticuerpo anti-ICAM1 no afecta la migración de HSPC (Figura 34B).

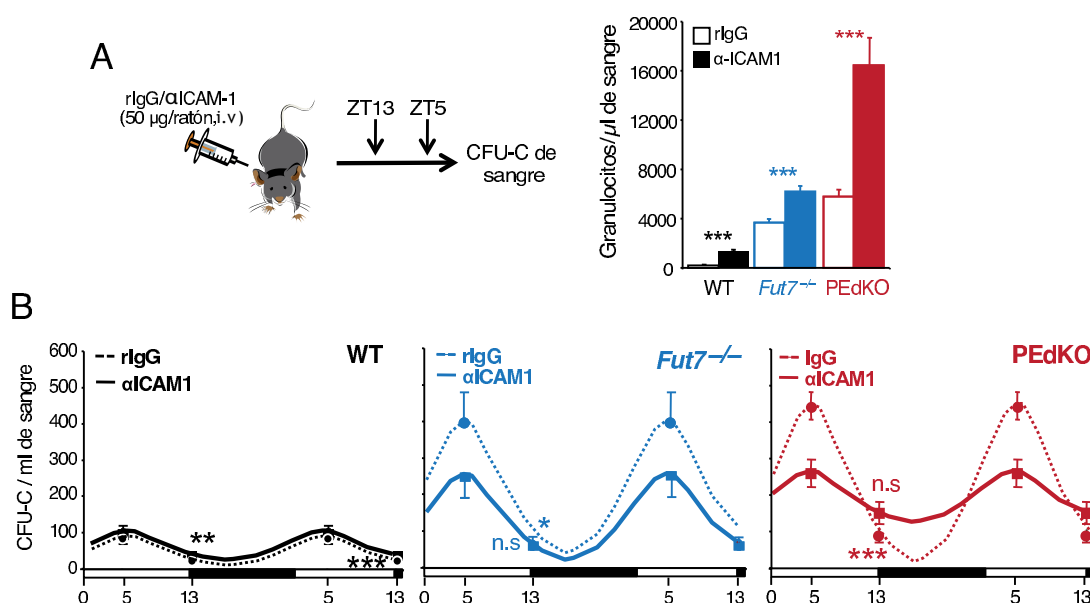


Figura 34: La inhibición del clearance de neutrófilos bloquea las fluctuaciones de HSPC.

A) Esquema del bloqueo de la eliminación de neutrófilos y niveles de neutrófilos en sangre de ratones WT, $Fut7^{-/-}$ y PEdKO control (rIgG) y tratados con anticuerpo α -ICAM1. B) Fluctuaciones circadianas de CFU-C en los animales mostrados en A. La línea discontinua refleja las fluctuaciones de CFU-C en animales control (rIgG) de los 3 genotipos. N=6-20 ratones por genotipo y grupo.

En experimentos adicionales observamos que el bloqueo con anticuerpo contra selectinas P y E en animales $CD18^{-/-}$ no muestra una interrupción de las fluctuaciones circadianas de HSPC, las cuales permanecen inalterables con respecto al control (Figura 35A). Estos resultados son opuestos a los obteni-

dos en ratones PEdKO en los que bloqueamos el receptor de integrinas $\beta 2$, ICAM1 (Figura 33D). Para dar explicación a estos resultados y analizar la contribución de integrinas en el clearance de neutrófilos, analizamos la eliminación de neutrófilos en tejidos de ratones quimera WT *Tg-DsRed: CD18^{-/-}*. Curiosamente, la ausencia de integrinas $\beta 2$ disminuye significativamente el clearance de neutrófilos en todos los órganos analizados excepto en hígado, donde se observa una acumulación neta de neutrófilos (Figura 33E). La discrepancia entre los resultados obtenidos en las fluctuaciones de progenitores

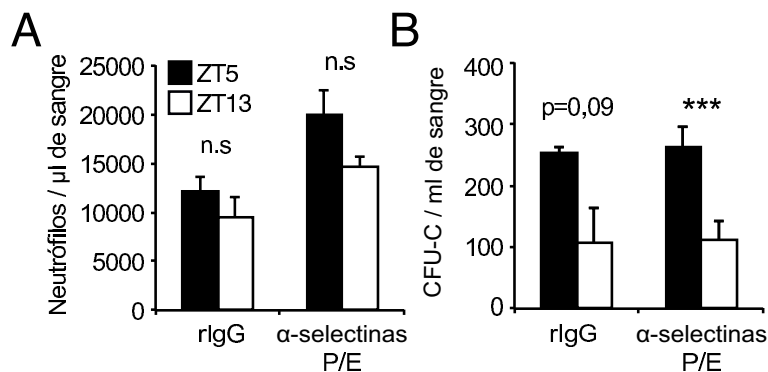


Figura 35: Oscilaciones circadianas en ratones *CD18^{-/-}*

A) Niveles de neutrófilos en circulación en animales *CD18^{-/-}* control (rlgG) y tratados con anticuerpo bloqueante de selectinas endoteliales P y E a ZT5 y ZT13. B) Niveles de progenitores o CFU-C en los animales analizados en A. N=3-5 ratones.

en el modelo PEdKO-anti-ICAM1 y el bloqueo con anticuerpo bloqueante contra selectinas endoteliales en *CD18^{-/-}*, podría deberse a las diferencias entre el bloqueo total de selectinas en el ratón PEdKO o el parcial inducido por el tratamiento con el anticuerpo.

Estos resultados demuestran por tanto que la eliminación homeostática de neutrófilos mediada por selectinas endoteliales y las integrinas $\beta 2$ e ICAM-1, regula los ritmos circadianos observados en progenitores hematopoyéticos y la eliminación multiorgánica de neutrófilos. Estos datos sugieren además que la ausencia de integrinas impide el clearance homeostático de neutrófilos y con ello, la modulación del nicho hematopoyético (Figura 34B).

A continuación analizamos las fluctuaciones circadianas de citoquinas hematopoyéticas en el contexto de la eliminación de neutrófilos en periferia, relacionada con el bucle de regulación de granulopoiesis IL-23/IL-17/G-CSF. En animales WT, los niveles de G-CSF en plasma presentan un patrón de oscilación circadiana (Figura 36A). Observamos además que los niveles de esta citoquina se encuentran alteradas en animales deficientes en selectinas o sus ligandos, a pesar de que las fluctuaciones en sus niveles a ZT5 y ZT13 se mantienen (Figura 36B). Para dilucidar si las oscilaciones en los niveles de G-CSF son responsables de las fluctuaciones circadianas de HSPC, bloqueamos G-CSF usando un anticuerpo bloqueante (203). Para ello diseñamos

un protocolo que permitiese el bloqueo de su actividad cuando los niveles de la citoquina son menores en circulación (ZT17) impidiendo de esta forma la movilización de una nueva ola de neutrófilos procedentes de médula ósea (Figura 36A). El bloqueo con G-CSF disminuyó significativamente los niveles de neutrófilos en circulación en WT, *Fut7*^{-/-} y PEdKO, pero las fluctuaciones circadianas de estas células no se vieron afectadas en ninguno de los 3 casos (Figura 36C). En paralelo, la inhibición in vivo de IL-17, un potente inductor de G-CSF (204), o el bloqueo con anti-G-CSF y anti-IL17 combinado tampoco afectó las oscilaciones de progenitores en circulación.

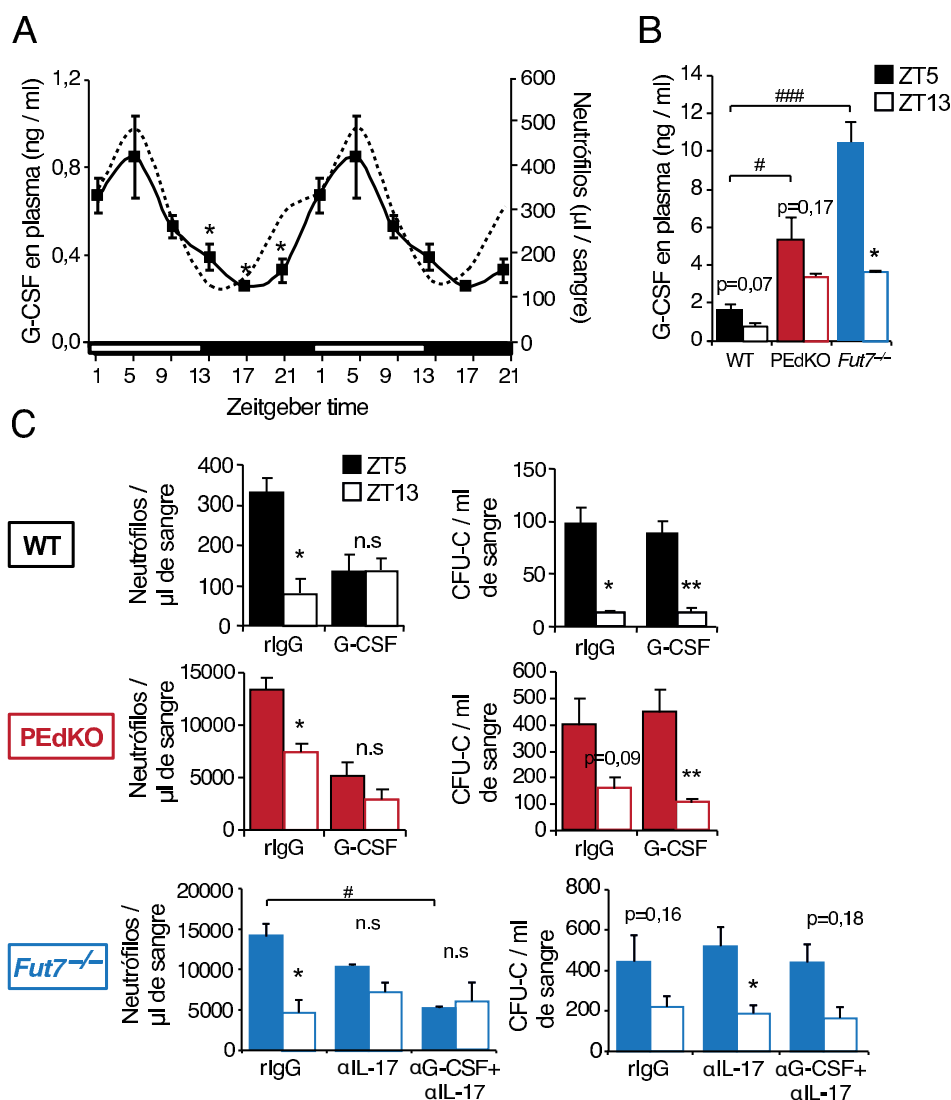


Figura 36: G-CSF no controla las oscilaciones circadianas de HSPC.

A) Niveles de G-CSF en plasma en animales WT durante el curso de un día (cuadrados negros). Como referencia se muestran los niveles de neutrófilos (línea punteada) en sangre a los mismos tiempos. N=3-4 ratones por tiempo. B) Niveles de G-CSF en plasma de animales WT, PEdKO y *Fut7*^{-/-} a ZT5 y ZT13. C) Fluctuaciones de neutrófilos y CFU-C en la sangre de animales WT, PEdKO y *Fut7*^{-/-} en ratones control (rlgG) o tratados con αG-CSF, αIL-17, o una combinación de ambas. N=3 ratones por genotipo y tratamiento. # Indica diferencia estadística entre los grupos señalados.

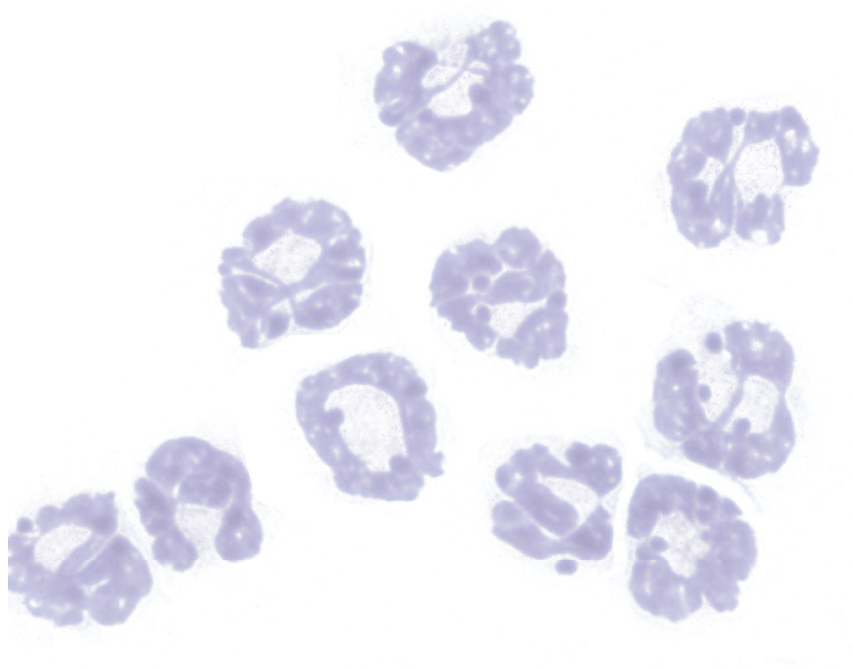
Estos resultados sugieren que el mecanismo que subyace al control de las oscilaciones circadianas de progenitores hematopoyéticos está controlado por la eliminación de neutrófilos en periferia mediado por ICAM-1 e integrinas β2.

Sin embargo este proceso es independiente a la regulación que se produce tras el clearance y los niveles de G-CSF y IL-17.

Estudios previos han demostrado el requerimiento de macrófagos CD169⁺ para la retención de HSPC en médula ósea (149) y para la atracción de neutrófilos a tejidos en condiciones inflamatorias (73). Para determinar si la oscilación de progenitores hematopoyéticos en tejidos periféricos podía estar regulada por poblaciones similares de macrófagos residentes en tejidos, estudiamos estas fluctuaciones en ratones CD169 control y tratados con toxina diftérica. La eliminación de macrófagos CD169⁺ provocó la pérdida de estas fluctuaciones circadianas (Figura 32B).

Estos resultados sugieren la existencia de órganos extramedulares donde existen células productoras de CXCL12 en los que los progenitores hematopoyéticos migran y se acumulan preferencialmente en determinados momentos del día. Los resultados demuestran asimismo que una población de macrófagos CD169⁺ modula directa o indirectamente su retención en estos órganos.

Discusión



Utilizando una combinación de marcadores de superficie hemos definido por citometría de flujo y funcionalmente la población de neutrófilos envejecidos en sangre. Los neutrófilos envejecidos se corresponden con una subpoblación que acumula una serie de alteraciones fenotípicas específicas mientras están en circulación, las cuales preceden su posterior eliminación en tejidos. En consonancia con la regulación circadiana que rige la actividad de la médula ósea, los neutrófilos aparecen, envejecen y desaparecen de la circulación siguiendo ritmos circadianos.

Mediante la utilización de técnicas de imagen in vivo, ensayos farmacológicos y el estudio de modelos genéticos animales hemos descrito que la eliminación de neutrófilos en la médula ósea provoca alteraciones en la actividad del nicho hematopoyético, lo que se traduce en una disminución de los niveles de CXCL12 y en consecuencia, en una movilización de los HSPC al torrente sanguíneo. Por otra parte, hemos constatado que la eliminación de neutrófilos no se produce de manera exclusiva en la médula ósea. Utilizando un modelo deficiente en ligandos de selectina *Fut7^{-/-}*, hemos analizado la presencia de neutrófilos en tejidos de periferia. La disrupción en el tráfico de estas células provoca alteraciones en la frecuencia de neutrófilos en tejidos y en los niveles de progenitores hematopoyéticos en sangre. Neutrófilos WT o deficientes en el receptor CXCR4 corrigen la neutrofilia en este modelo, lo que sugiere una eliminación de neutrófilos en órganos distintos a médula ósea. Finalmente, la eliminación de neutrófilos en periferia contribuye a mantener los niveles de HSPC en circulación y la homeostasis del nicho hematopoyético de médula ósea.

Nuestros estudios indican la existencia de dos bucles que regulan los niveles de HSPC en circulación: la eliminación de neutrófilos en la médula ósea, y el *clearance* en tejidos extramedulares (Figura 37). La eliminación de neutrófilos constituye por tanto uno de los mecanismos que mantiene en el organismo de niveles homeostáticos de HSPC, y establece nuevas conexiones entre el sistema inmune y el hematopoyético o regenerativo.

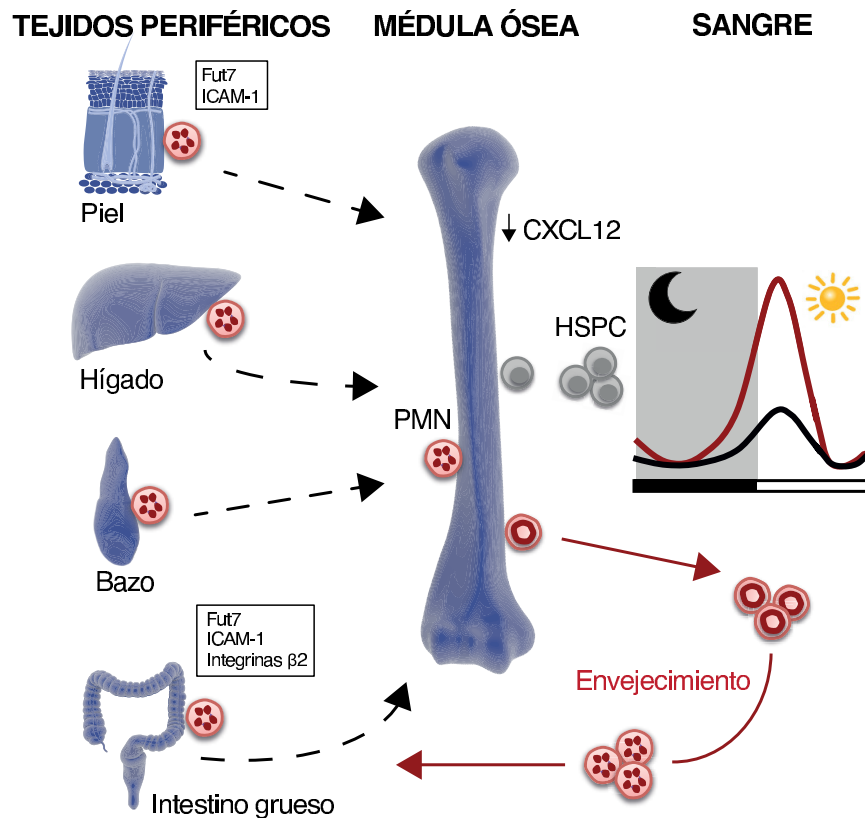


Figura 37: La eliminación de neutrófilos modula el nicho hematopoyético.

En el esquema se muestra el envejecimiento de neutrófilos en circulación (líneas granates) y su eliminación fisiológica o clearance en tejidos. La eliminación de neutrófilos en periferia (piel, hígado, bazo e intestino grueso) y en médula ósea, regula la actividad del nicho hematopoyético localmente o de forma remota (líneas discontinuas). La consecuencia de esta modulación se traduce en variaciones en los niveles de HSPC en circulación y CXCL12 en médula ósea. Todo este proceso se produce diariamente y está coordinado por ritmos circadianos. Defectos en el tráfico de neutrófilos provocan alteraciones de los niveles homeostáticos de HSPC en circulación (línea continua granate comparada con la condición basal en negro).

1. ENVEJECIMIENTO DE NEUTRÓFILOS.

Los neutrófilos han sido descritos como células kamikaze debido a su rápido reclutamiento a tejidos diana, dentro del cual liberan un arsenal de enzimas citotóxicas y mueren (205).

La cascada de migración leucocitaria induce una serie de modificaciones en la fisiología del neutrófilo. En oposición al modelo por el cual la transmigración del neutrófilo a tejido precede su eliminación, en los últimos años se ha documentado la existencia de un proceso conocido como transmigración reversa por el cual los neutrófilos extravasados en tejido pueden re-entrar en la circulación (74). La población de neutrófilos con esta capacidad (que pasan a expresar niveles elevados de ICAM-1) presenta una extensión de su vida media comparada con la de neutrófilos en circulación (206) y un aumento de su capacidad migratoria y citotóxica (207). Otros estudios han demostrado la existencia de subtipos de neutrófilos con perfiles fenotípicos y funcionales

diferentes en el contexto inflamatorio (208). Sin embargo, a pesar del conocimiento de la existencia de la heterogeneidad funcional de neutrófilos durante años (209) no se había descrito hasta el momento un contexto fisiológico en el que varias poblaciones de neutrófilos co-existiesen.

A pesar de ser células esenciales en el sistema inmune innato, los neutrófilos se producen muy por encima de las necesidades del organismo en condiciones basales. Este hecho fuerza al organismo a la presencia de múltiples reservorios para su almacenamiento, así como a la preparación de sistemas de control para su movilización diaria de médula ósea a sangre, su distribución en tejidos, y su eliminación coordinada. La eliminación de células con potencial nocivo para el organismo se ha relacionado con cambios en la expresión o en la exposición de moléculas en la membrana que favorecen su eliminación (9). En el marco de la respuesta inflamatoria, los neutrófilos mueren por un proceso de muerte programada o apoptosis, lo que conlleva la exposición de fosfatidilserina en la membrana externa. El efecto neto de la eliminación de neutrófilos apoptóticos sirve para frenar la respuesta inflamatoria y promover su resolución (17). En condiciones no inflamatorias, no se detectan neutrófilos apoptóticos en circulación (108). Dada la extensa producción diaria de estas células y la vida media corta que las caracteriza, es lógico proponer la existencia de mecanismos encargados de la eliminación eficiente de los neutrófilos de la circulación antes de su muerte, evitando efectos nocivos en el organismo. Los resultados reflejados en esta tesis demuestran que el envejecimiento natural de neutrófilos constituye uno de estos mecanismos (Figura 20C).

Nuestros resultados revelan que los neutrófilos en circulación sufren una serie de alteraciones durante el envejecimiento entre las que destacan la disminución de los niveles de CD62L y el aumento de la expresión de CXCR4 en su membrana (Figura 5). La maduración de neutrófilos puede ser detectada asimismo por el desarrollo de segmentación del núcleo (Figura 4). Los neutrófilos inmaduros poseen un núcleo de morfología de anillo en médula ósea que se transforma gradualmente en una morfología multilobulada (34). Nuestros resultados corroboran la existencia de reordenaciones en el núcleo durante el proceso de envejecimiento en neutrófilos, que ocurren además de manera coordinada con modificaciones en los receptores de membrana (Figura 4).

Se ha especulado sobre la idea de que la forma multilobulada del núcleo de neutrófilos podría facilitar la migración a través de las paredes de los vasos sanguíneos (210). Las laminas A y C son proteínas de la membrana del núcleo que controlan funciones celulares diversas entre las que destacan la organización y la estabilidad mecánica de la cromatina, la transcripción, la replicación

del DNA, así como la polarización de células durante la migración (211). Resultados preliminares de nuestro laboratorio han correlacionado cambios a nivel de RNA mensajero y de proteína en los niveles de lamina A en neutrófilos envejecidos. De esta forma, podríamos pensar que el envejecimiento y las reordenaciones que se producen en el núcleo mediadas por lamina A u otras proteínas, preceden la eliminación de estas células que han transmigrado a tejidos. En apoyo de esta hipótesis un estudio reciente ha relacionado la sobreexpresión in vitro de lamina A en células HL-60 (promielocitos humanos) con la reducción en la migración de estas células a través de poros de reducido diámetro (212). Por tanto, alteraciones en la morfología del núcleo mediadas por lamina A podrían ocurrir asociadas al proceso de envejecimiento y a la eliminación de neutrófilos.

Los neutrófilos envejecen rápidamente en la circulación, lo que puede comprometer su función en la respuesta innata y precisaría de su eliminación de la sangre. Defectos en el tráfico de neutrófilos (Figura 24 y 26A) promueven una expansión de esta población y una mayor susceptibilidad a infecciones. Los neutrófilos envejecidos expresan niveles elevados del receptor CXCR4 lo que en teoría les capacitaría con un mayor tropismo hacia la médula ósea, donde los niveles de CXCL12 son constitutivamente altos (Figura 4E) (90). Nuestros datos sin embargo, indican que la población envejecida que expresa niveles más altos este receptor, no posee ninguna ventaja sobre la población CD62L-HICXCR4^{LO} en lo que respecta a migración a médula ósea (Figura 15E). No obstante, la población de neutrófilos envejecidos CXCR4^{HI} sí presenta una atracción mayor hacia macrófagos medulares (Figura 15E) los cuales son una fuente potencial de CXCL12 en médula ósea (213), así como una mayor tasa de eliminación que la población de neutrófilos jóvenes.

Estas observaciones sugieren que las alteraciones de receptores de membrana en los neutrófilos podrían facilitar la migración local de neutrófilos hacia áreas específicas en tejidos, que permitan el reconocimiento y su eliminación a través de fagocitos.

Por otra parte, hemos observado que el perfil de expresión de RNA mensajero en neutrófilos envejecidos está enriquecido en receptores de adhesión y quimioquinas relacionadas con inflamación. La expresión de CD62L y CD11b en neutrófilos envejecidos (Figura 4E) junto a los datos de expresión transcripcional, recuerdan al fenotipo de neutrófilos activados (214) lo que sugiere que el envejecimiento podría ser una forma de activación que determina el momento de la eliminación de neutrófilos en condiciones basales y que comparte rutas de señalización comunes a inflamación. En apoyo de esta afirmación

un estudio de Suratt y colaboradores (106) demostró que la eliminación de neutrófilos depende en gran medida del grado de activación y maduración de estas células. Nuestros resultados demuestran que la población CD62L^{LO}CXCR4^{HI} presenta además una reducción de la expresión de la molécula CD47, lo que podría favorecer la fagocitosis de neutrófilos envejecidos in vivo (166).

Actualmente nos encontramos investigando las señales que controlan el proceso de envejecimiento en neutrófilos. Curiosamente, experimentos iniciales de reconstitución en animales WT con médula ósea procedente de animales WT y *Cxcr2*^{-/-} han demostrado que los neutrófilos del donante deficiente para el receptor CXCR2 presentan un fenotipo menos envejecido. Estos resultados sugieren por tanto que ciertos receptores podrían contribuir particularmente al envejecimiento de neutrófilos en condiciones homeostáticas de una manera que es intrínseca a la célula. Por otra parte, estamos generando dos líneas de ratones en los que específicamente hemos eliminado la expresión en neutrófilos de genes del reloj molecular o hemos eliminado genes relacionados con la regulación transcripcional de la expresión de estos genes para evaluar el mecanismo molecular que sincroniza envejecimiento y eliminación de neutrófilos.

En resumen, hemos identificado mediante los marcadores CXCR4 y CD62L la población de neutrófilos envejecidos en circulación cuyos niveles fluctúan en sangre. El mecanismo de envejecimiento de neutrófilos parece ser independiente de factores extrínsecos y en estudios futuros analizaremos en detalle el mecanismo que regula este proceso. Definida la población de neutrófilos envejecidos nos preguntamos a continuación si la eliminación de neutrófilos influye en la fisiología de los órganos en los que se produce.

2. ELIMINACIÓN DE NEUTRÓFILOS EN EL ORGANISMO.

La presencia de neutrófilos en reservorios repartidos en el organismo permite un reclutamiento efectivo de estas células en inflamación. En homeostasis, los neutrófilos presentan una distribución ubicua (Figura 22) y deficiencias en su tráfico promueven alteraciones en esta distribución (Figura 26A). Los resultados reflejados en nuestro estudio apuntan a que la eliminación de neutrófilos regula de manera indirecta la producción y distribución de neutrófilos en el organismo y restablece el tráfico de HSPC y la homeostasis del nicho hematopoyético.

En nuestros estudios hemos analizado la presencia de neutrófilos en el organismo en animales *LysM^{Gfp}* (Figura 22). En este modelo, los neutrófilos se encuentran distribuidos principalmente en la médula ósea, la sangre, el pulmón y el músculo esquelético. Posteriormente, hemos analizado la eliminación de neutrófilos procedentes de sangre en el modelo de parabiosis con animales WT (Figura 23). Estos datos han evidenciado el tráfico de neutrófilos en condiciones homeostáticas desde la sangre a órganos anteriormente no descritos como el intestino grueso, la piel, la grasa o el músculo esquelético.

Contribución de selectinas, ligandos de selectina e integrinas en el proceso de clearance

Por otro lado hemos analizado que el proceso de eliminación de neutrófilos requiere de una serie de receptores y ligandos específicos para cada tejido (Figura 33). Mediante microscopía intravital y ensayos de reconstitución de médula ósea, hemos comprobado que la eliminación de neutrófilos en tejido requiere selectinas e integrinas (Figura 33). Neutrófilos deficientes en el ligando de selectinas *Fut7* o en el receptor CXCR4, no infiltran correctamente la médula ósea (Figura 8 y 26), así como los neutrófilos *Fut7^{-/-}* presentan un problema de eliminación en piel e intestino grueso en el modelo de parabiosis (Figura 26). Estos resultados confirman que la eliminación de neutrófilos está estrictamente regulada por pares receptores-ligando, y que las interacciones entre estos pares son específicas para cada tejido.

Contribución de macrófagos residentes y señales LXR

En nuestros experimentos hemos encontrado que la presencia de macrófagos y de señales LXR son componentes esenciales para la modulación del nicho hematopoyético durante la eliminación de neutrófilos en condiciones basales (Figuras 16, 17 y 28). Estudios recientes han demostrado un papel primordial de macrófagos en el mantenimiento de HSPC en la cavidad medular, a través de factores desconocidos (149, 151). Hemos descubierto que los neutrófilos envejecidos migran hacia regiones enriquecidas en macrófagos, lo que determina su posterior eliminación (Figura 15).

Los neutrófilos deficientes en *Fut7* presentan un *clearance* en médula ósea menos eficiente comparado con neutrófilos WT (Figura 8). Los ratones *Fut7^{-/-}* presentan neutrofilia y niveles de progenitores elevados (Figura 24). En vista a estos resultados decidimos analizar el proceso de eliminación de neutrófilos en otros tejidos para establecer una conexión entre la eliminación de neutrófi-

los y el tráfico desregulado de HSPC en este modelo. En concreto hemos observado que los neutrófilos deficientes en *Fut7* no se eliminan correctamente en piel e intestino grueso (Figura 26A).

Para relacionar los resultados de eliminación de neutrófilos en circulación con el proceso de eliminación activa o fagocitosis hemos analizado este proceso en macrófagos de tejido de animales *Fut7*^{-/-}. Mediante el modelo de parabiosis, hemos observado que los neutrófilos son eliminados principalmente por macrófagos en bazo, médula ósea e hígado, y sorprendentemente, en el intestino grueso (Figura 27). Sin embargo en tejidos donde el *clearance* de neutrófilos WT es significativo como la piel o el músculo esquelético, no hemos detectado fagocitosis lo cual sugiere un tránsito temporal de neutrófilos en estos órganos.

La eliminación de macrófagos con clodronato en parejas de parabiontes *Fut7*^{-/-} sugiere que las poblaciones de macrófagos de médula ósea, bazo e hígado no son requeridas para la modulación del nicho hematopoyético (Figura 28), aunque por otro lado sean de las más activas fagocitando neutrófilos (Figura 27). Estos resultados son opuestos a los observados en animales WT en médula ósea, donde la presencia de macrófagos resulta fundamental para el proceso de movilización diaria de HSPC (Figura 20B). A priori podríamos pensar que la población de macrófagos susceptible de eliminación con clodronato es prescindible para el *clearance* de neutrófilos en periferia. Sin embargo, en ausencia de macrófagos que expresan la sialoadhesina CD169 y que también desaparecen con clodronato (hígado, bazo y médula ósea) se produce una desregulación del tráfico de HSPC a nivel global, lo que nos invita a pensar lo contrario (Figura 32).

Nuestros resultados no excluyen por tanto la posibilidad de que los macrófagos de otros tejidos modulen de forma remota la respuesta del nicho en ausencia de las poblaciones fagocíticas en médula ósea, bazo e hígado. Dada la enorme heterogeneidad y plasticidad a nivel funcional y fenotípico de los monocitos y los macrófagos, una posible explicación a estos resultados sería que poblaciones de macrófagos diferenciadas de novo, o residentes en otros tejidos se encarguen de la fagocitosis de neutrófilos en este escenario. En conjunto, la eliminación coordinada de neutrófilos mediante señales similares a las que ocurren en médula ósea (LXR) podría modular la actividad del nicho hematopoyético.

Estudios previos han demostrado la existencia en la mucosa del intestino de células T secretoras de IL-17, la cual es importante en la regulación de los niveles homeostáticos de neutrófilos en circulación (215). La eliminación en-

dógena de neutrófilos *Fut7*^{-/-} en este órgano está reducida (Figura 26A) y los niveles de IL-17 se encuentran incrementados en animales con problemas en el tráfico de neutrófilos (189). Estas evidencias sugieren que el *clearance* de neutrófilos WT en el intestino de animales *Fut7*^{-/-} podría restablecer la homeostasis de la producción de IL-17 y con ello los niveles de neutrófilos y HSPC. Además, existen poblaciones específicas de macrófagos intestinales que expresan la sialoadhesina CD169 (216) y junto con otras poblaciones de macrófagos CD169+, podrían ser responsables directa o indirectamente de la regulación del nicho hematopoyético en animales con deficiencias en el tráfico de neutrófilos.

En este escenario de señalización multiorgánica, la detección de uno o varios de estos factores resulta extremadamente compleja. Por este motivo nuestro siguiente paso será el análisis de genes mediante qPCR implicados en fagocitosis y respuesta de nicho (*Scf*, *Cxcl12*, *Vcam1* y *Angpt1*) en los órganos de interés (intestino grueso, piel y médula ósea). Para comprobar si la población o poblaciones de macrófagos que expresan el receptor CD169 es importante en el proceso de eliminación de neutrófilos, actualmente estamos generando ratones *Fut7*^{-/-} x CD169-DTR, donde podremos eliminar las poblaciones de macrófagos CD169 mediante toxina diftérica (149). El análisis de estos animales nos permitirá definir la contribución de los subtipos de macrófagos en la regulación remota del tráfico de HSPC.

La activación de receptores nucleares LXR induce cambios transcripcionales y funcionales tras la fagocitosis de células apoptóticas (200). Nuestros resultados demuestran que los receptores LXR (Figura 17) modulan la respuesta del nicho hematopoyético y la movilización de HSPC a sangre. Además, el *clearance* de neutrófilos en médula ósea induce la oscilación en la expresión de genes diana de LXR (*Abca1* y *Mertk*) (Figura 17B) en macrófagos. Como consecuencia de esta modulación, los niveles de HSPC fluctúan en sangre (Figuras 17C y 20). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de la modulación del nicho hematopoyético por la activación de receptores LXR ocurra de forma exclusiva en macrófagos, ya que otras poblaciones de médula ósea también expresan ambas isoformas de receptores LXR (Figura 17A). Estudios recientes han demostrado que la expresión de transportadores reversos de colesterol ABC en células del linaje mieloide son fundamentales para la movilización de progenitores hematopoyéticos (191). Por tanto, la caracterización de las células del nicho hematopoyético que expresan receptores LXR será fundamental para discriminar el papel de su activación en la regulación del nicho hematopoyético.

Complementariamente, se ha atribuido una función para estos receptores en

la eliminación de neutrófilos en periferia (190). Los macrófagos de ratones LXRdKO no eliminan eficientemente neutrófilos lo que resulta en una acumulación neta de los mismos en sangre, bazo e hígado (190). Mediante estudios in vitro los autores demostraron que la neutrofilia presente en animales LXRdKO es consecuencia de un defecto en eliminación junto a una disfunción del eje que controla los niveles de G-CSF, ocasionando neutrofilia en estos animales. Aunque estos estudios no excluyen otras alteraciones secundarias que produzcan granulopoiesis, proveen evidencias firmes de que la activación de estos receptores en fagocitos concretos de tejidos periféricos podría participar igualmente en la modulación remota del nicho hematopoyético.

Papel del bazo en clearance de neutrófilos

La eliminación del bazo parece ser crucial para la corrección de los niveles de HSPC en el modelo *Fut7^{-/-}* (Figura 28). El bazo actúa como órgano hematopoyético en condiciones patológicas (41, 42) y animales con defectos en tráfico de granulocitos presentan hematopoiesis extramedular en este órgano (85). Ratones WT en los que el bazo ha sido eliminado mediante cirugía (esplenectomía) presentan un aumento de los niveles neutrófilos en circulación y HSPC. En este sentido, la contribución doble del bazo como órgano donde se produce eliminación de neutrófilos (Figura 27) y como órgano hematopoyético, podría explicar estos resultados. Por un lado, los macrófagos del bazo contribuirían a la eliminación de neutrófilos y su ausencia explicaría una pérdida posterior de la modulación del nicho. Sin embargo, en vista de los resultados de eliminación de macrófagos con clodronato esta explicación no parece ser la más plausible, ya que los macrófagos de este órgano son prescindibles para la regulación del tráfico de HSPC.

Nuestra hipótesis acerca de este mecanismo contempla la comunicación entre los dos órganos hematopoyéticos principales en el organismo, la médula ósea y el bazo. En animales esplenectomizados las señales producidas por la eliminación de neutrófilos en tejidos no serían integradas por el bazo, que actuaría como un sensor en periferia de los niveles de neutrófilos. En ausencia de esta señal, la comunicación entre la médula ósea y el bazo permanece bloqueada, lo que conlleva una desregulación de la actividad del nicho hematopoyético en ratones *Fut7^{-/-}*. Para probar esta hipótesis en la actualidad estamos realizando experimentos en los que caracterizaremos el *clearance* de neutrófilos y la respuesta del nicho en animales *Fut7^{-/-}* esplenectomizados.

Clearance y marginación de neutrófilos

En nuestro modelo experimental es importante discriminar entre la desaparición definitiva de neutrófilos de circulación o *clearance*, y el tráfico temporal o almacenamiento de neutrófilos en la vasculatura de órganos que puedan actuar como reservorios temporales (marginación). Estudios clásicos y más recientes han puesto su interés en el denominado reservorio marginado de neutrófilos, que refleja este sistema de reserva adicional además del que encontramos en los órganos granulopoiéticos. Uno de estos reservorios es el pulmón. Se ha comprobado que el inhibidor de CXCR4 AMD3100, recluta neutrófilos a circulación procedentes de pulmón sin afectar el reservorio de médula ósea (97). Este hecho implicaría que el pool de neutrófilos marginados en pulmón difiere funcionalmente del presente en médula ósea, a pesar de que la retención de neutrófilos en estos órganos esté regulado por el mismo receptor, CXCR4. Se desconoce la naturaleza exacta del pool de neutrófilos marginados, así como el mecanismo que produce la marginación hacia órganos particulares. En nuestros experimentos hemos observado que los neutrófilos se marginan rápidamente a pulmón, hígado y bazo. Sin embargo, esta marginación sólo correlaciona con *clearance* y eliminación activa por fagocitosis, en bazo e hígado (Figuras 26 y 27). La marginación de neutrófilos en pulmón, hígado y bazo supondría un almacenamiento temporal de estas células, que podría estar coordinada con el proceso de envejecimiento. La eliminación de neutrófilos envejecidos en médula ósea, hígado, bazo e intestino sincronizaría la movilización de neutrófilos de estos reservorios, los cuales envejecerían en circulación y serían posteriormente eliminados. Es posible por tanto que la marginación y el *clearance* de neutrófilos sean eventos independientes, pero coordinados en la eliminación multiorgánica de neutrófilos.

En ratones reporteros para la expresión de CXCL12 hemos comprobado que existen células de distintos tipos que producen esta quimioquina en otros órganos diferentes de la médula ósea (Figura 30A). Células endoteliales y estromales expresan CXCL12, por lo que los neutrófilos que expresan CXCR4 podrían migrar en respuesta a gradientes dinámicos hacia estos órganos al igual que ocurre en médula ósea. Sin embargo, actualmente no hemos cuantificado la cantidad absoluta de CXCL12 que se produce por órgano lo cual formará parte de nuestros análisis futuros. Diferencias cuantitativas más que cualitativas podrían ser clave en la atracción de neutrófilos envejecidos que expresen CXCR4 hacia estos gradientes y esto podría ser uno de los factores determinantes en la eliminación de neutrófilos.

Nuestros resultados no excluyen la posibilidad de que otro factor o factores

junto a CXCL12 determinen la migración y posterior *clearance* de neutrófilos. En este sentido, la existencia de gradientes de moléculas tipo eat-me que promueven la eliminación de neutrófilos, o moléculas puente como MFGE8 o GAS6 que lo facilitan, podría favorecer su eliminación en órganos concretos. En este sentido, ratones deficientes en GAS6 y en MFGE8 presentan neutrofilia en sangre (Figura 29 y (190)). MFGE8 ha sido previamente implicado en la eliminación de linfocitos apoptóticos y en el desarrollo de autoinmunidad debido a la acumulación de estas células en bazo por defectos en su fagocitosis (217). El procesamiento o la fagocitosis de neutrófilos podría ser un mecanismo ordenado que precise de moléculas como MFGE8, como en el caso de la eliminación de linfocitos en el timo o en el bazo. En el futuro analizaremos el proceso de *clearance* en animales deficientes para Fut7 y MFGE8, con el fin de probar si la eliminación de este factor impide la eliminación homeostática de neutrófilos en determinados tejidos.

Regulación circadiana de la eliminación de neutrófilos

Los neutrófilos fluctúan en circulación presentando valores máximos a ZT5 y mínimos entre ZT13-ZT17 (Figura 5B). Mediante experimentos de microscopía intravital hemos observado que los niveles mínimos de neutrófilos en sangre coinciden con una mayor interacción con la vasculatura y extravasación en tejidos como músculo esquelético y piel (Figura 33). Estos experimentos sugieren que el proceso de *clearance* está programado específicamente en determinados momentos del día.

Este proceso está regulado además por una mayor expresión de receptores relacionados con la migración de leucocitos y específico para cada tejido (60). Así, la mayor expresión del receptor ICAM-1 a ZT13 determina la eliminación de neutrófilos en músculo esquelético y piel, y probablemente, en múltiples tejidos en periferia. Por otra parte, la migración de leucocitos a médula ósea es dependiente de las selectinas P y E y ocurre preferencialmente a ZT13 (60). De acuerdo con estas observaciones, nuestros datos demuestran que la eliminación de neutrófilos en periferia es parcialmente independiente de selectinas (Figura 33 C y D). Contrariamente, la presencia de ICAM-1 en el endotelio y de sus receptores las integrinas $\beta 2$ en el neutrófilo, son fundamentales para la trans migración de los mismos en tejido y su posterior eliminación (Figura 33C-E).

El proceso de eliminación de neutrófilos en periferia depende principalmente del eje ICAM-1-integrinas $\beta 2$ (Figura 33E) y es independiente de las selectinas endoteliales P y E en los tejidos analizados (Figura 33C-D). Sorprendentemente-

te, hemos observado que el bloqueo del *clearance* de neutrófilos mediado por estos receptores participa en la regulación remota del nicho y de los niveles de HSPC en la sangre de animales *Fut7^{-/-}* y PEdKO, conectando la eliminación de neutrófilos en periferia con la regulación de la actividad del nicho hematopoyético (Figura 25B y 34B).

Por tanto, selectinas e integrinas cooperan en la eliminación de neutrófilos en tejidos periféricos y el *clearance* de neutrófilos en órganos distantes instruye a la médula ósea de las señales necesarias para la regulación de los niveles homeostáticos de HSPC.

3. MODULACIÓN DEL NICHOS HEMATOPOYÉTICO POR ELIMINACIÓN DE NEUTRÓFILOS

La eliminación de neutrófilos en periferia se ha relacionado previamente con la regulación del nicho hematopoyético (189). En estos estudios se sugirió que el *clearance* de neutrófilos en tejidos la realizan macrófagos y células dendríticas residentes en pulmón, bazo y nódulos linfáticos mesentéricos. Mediante este mecanismo se demostró que la fagocitosis in vitro de neutrófilos regula la producción de las citoquinas IL-23 y IL-17, ésta última responsable directa de la producción de G-CSF, que puede inducir a su vez proliferación y movilización de progenitores hematopoyéticos (218).

Clearance en periferia y regulación por G-CSF

La correlación entre los niveles de G-CSF y el número de neutrófilos en circulación hizo que se postulase la teoría del neutrostato por la que los niveles de esta citoquina serían los responsables últimos de la producción de neutrófilos en función de la demanda en cada momento del organismo (219). Una reformulación de esta teoría vino de la mano del laboratorio de Klaus Ley, relacionando los mecanismos reguladores de la producción de neutrófilos con el proceso de eliminación de los mismos: en modelos animales donde el tráfico de neutrófilos está parcialmente impedido por la ausencia de receptores implicados en migración, la transferencia y la consiguiente fagocitosis de neu-

trófilos WT restablece los niveles de neutrófilos en circulación, inhibiendo la producción de G-CSF (189).

En una visión más amplia de estos resultados estas evidencias demuestran que la actividad del nicho hematopoyético, y en concreto, la generación de granulocitos puede regularse por la presencia de sensores (fagocitos) en periferia vía G-CSF.

En este trabajo hemos observado que los niveles de G-CSF fluctúan en plasma siguiendo la misma tendencia que neutrófilos y HSPC en animales WT (Figura 36A). Consecuentemente, animales con defectos en migración de neutrófilos presentan niveles de G-CSF elevados (Figura 36B) ya que presuntamente, no se inhibe el bucle IL23/IL17/G-CSF antes mencionado. Inesperadamente, en este escenario las oscilaciones circadianas de HSPC permanecen intactas (Figura 34B). Un hallazgo importante es que la respuesta del nicho hematopoyético en animales *Fut7*^{-/-} se puede alterar bajo determinadas circunstancias: la transferencia de neutrófilos puede inducir en unos casos la movilización de HSPC pero en otras ocasiones promueve una corrección de los niveles de HSPC (Figura 18) en sangre. La respuesta del nicho hematopoyético está por tanto sujeta a modulación por distintos factores, donde la producción de G-CSF en periferia desempeña un papel fundamental (46, 189).

Para conocer si el *clearance* de neutrófilos en periferia regula la respuesta dependiente de G-CSF del nicho hematopoyético, analizamos los niveles de progenitores hematopoyéticos en sangre en distintos escenarios de eliminación de neutrófilos. Únicamente encontramos una corrección de los valores de HSPC en ratones expuestos a neutrófilos WT y deficientes para el receptor CXCR4 (Figura 25B). Estos datos sugieren que la eliminación de neutrófilos por fagocitos es independiente de su infiltración en médula y ocurre preferencialmente en órganos periféricos. Esta eliminación, sin embargo, es detectada por el nicho hematopoyético de médula ósea (Figura 25C).

El bloqueo de las citoquinas que participan en el bucle de eliminación de neutrófilos en periferia es decir IL-17 y G-CSF, no tuvo un impacto en los niveles de HSPC en circulación ni en su cinética circadiana (Figura 36C). Por otra parte, en modelos de neutropenia genética hemos observado que los niveles de progenitores hematopoyéticos fluctúan normalmente. Estos resultados indicarían que otras vías alternativas participan en el mantenimiento de las oscilaciones circadianas de HSPC. En este sentido, las HSPC podrían oscilar mediante mecanismos intrínsecos, como la regulación circadiana controlada por genes del reloj molecular.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la eliminación de neutrófilos modula las oscilaciones circadianas de HSPC (Figura 34B), pero las fluctuaciones de progenitores hematopoyéticos per se están controladas por los componentes moleculares que constituyen el reloj circadiano. En la actualidad estamos generando dos modelos murinos para eliminar la expresión específica de genes reloj o de sus reguladores en neutrófilos. Estos modelos nos serán de utilidad para corroborar que el *clearance* circadiano de neutrófilos regula la actividad rítmica del nicho hematopoyético.

Nichos periféricos

Los resultados obtenidos con el modelo *Fut7^{-/-}* sugieren que existen cambios a nivel de CXCL12 en médula ósea como consecuencia de la eliminación de neutrófilos en periferia (es decir, extramedular) (Figura 25C). Existen evidencias previas de la expresión de CXCL12 en distintos tejidos así como de otras citoquinas relacionadas con granulopoiesis o tráfico de HSPC (46). Igualmente, estudios recientes han demostrado la existencia de hematopoiesis extramedular en tejidos como el bazo en circunstancias de estrés y anomalías en el tráfico de granulocitos (41, 195).

Hemos encontrado que las poblaciones de HSPC en bazo, en hígado y en la médula ósea, fluctúan (Figura 32A). En paralelo, hemos encontrado que las células que producen CXCL12 se encuentran localizadas en múltiples tejidos (Figura 30A). Estas evidencias nos incitan a especular sobre la posible existencia de nichos accesorios en el organismo. De la misma forma que el nicho hematopoyético de médula ósea, los nichos periféricos podrían estar controlados por mecanismos similares o distintos. De esta forma la presencia de HSPC en determinados órganos sugiere un tráfico constante de estas células en el organismo (Figura 32A). Guiadas por gradientes de citoquinas las HSPC circularían a través de estos nichos en determinados momentos del día. El tráfico de HSPC contribuiría de esta forma a la defensa inmune a través de la diferenciación in situ de células mieloides efectoras, dotando al organismo de un sistema de defensa adicional (38, 158).

Por otro lado, hemos encontrado que los macrófagos CD169 son fundamentales para la modulación del nicho en médula ósea, pero parecen jugar un papel importante también en periferia. La eliminación específica de poblaciones CD169+ en hígado, bazo y médula ósea ocasiona una pérdida total de las oscilaciones circadianas de HSPC (Figura 32B). Las poblaciones de macrófagos que expresan CD169 incluyen a macrófagos metalofílicos y de la zona marginal del bazo, macrófagos de nódulos linfáticos y macrófagos de médula ósea

(220). Curiosamente, el bazo y los nódulos linfáticos son tejidos donde se ha descrito la existencia o el tráfico de HSPC en condiciones homeostáticas y de inflamación (26, 42, 158, 221). Igualmente, se ha descrito la presencia de macrófagos que expresan esta sialoadhesina en piel e intestino (73, 216). Por tanto, los macrófagos CD169+ podrían constituir un componente clave y un criterio unificador para la identificación de nuevos nichos hematopoyéticos.

La existencia de nichos en periferia con potencial actividad hematopoyética plantea la cuestión fundamental de si los factores y las células que los integran poseen algún paralelismo con los que se encuentran en el nicho de médula ósea. Para conocer si este u otros gradientes podrían condicionar la respuesta de los nichos en periferia actualmente estamos analizando mediante qPCR los perfiles de expresión de genes relacionados con la actividad hematopoyética del nicho, como *Scf*, *Cxcl12*, *Vcam1* y *Angpt1* en los órganos identificados como importantes durante el *clearance* de neutrófilos.

Otros mecanismos de regulación de generación de neutrófilos y tráfico de HSPC

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel de los microorganismos del tracto intestinal como reguladores de la granulopoiesis en condiciones basales y en respuestas de emergencia. Así, ratones libres de patógenos (germ-free) desarrollan neutropenia y las señales derivadas de la microbiota son necesarias para la maduración de neutrófilos en condiciones homeostáticas (222). En un estudio reciente se demostró que la neutropenia inducida por el anticuerpo Ly6G, promueve elevaciones temporales de G-CSF en médula ósea y un aumento de la granulopoiesis como respuesta a su eliminación. En animales deficientes para el receptor TLR4 o TRIF -su adaptador- esta respuesta está bloqueada sugiriendo que los ligandos de receptores TLR activados por la microbiota promueven la generación de neutrófilos (223). Las HSPC expresan receptores TLR y su activación induce diferenciación hacia el linaje mieloide (36). Igualmente, el estroma y el endotelio también participan en la detección de señales derivadas de microorganismos e indirectamente en granulopoiesis, mediante la producción de factores que la promueven como G-CSF (35, 46). Por tanto, la generación de neutrófilos y el tráfico de HSPC forman parte de un proceso complejo donde el *clearance* de neutrófilos y la microbiota tiene un papel determinante. Curiosamente, resultados preliminares del laboratorio han demostrado que el proteoma de neutrófilos envejecidos está enriquecido en CD14, una molécula sensor de niveles de endotoxina, entre otras moléculas implicadas en inflamación y metabolismo oxidativo.

Precisamente, los neutrófilos deficientes en *Fut7*^{-/-} poseen un defecto de eliminación en piel e intestino (Figura 26), dos de los órganos que albergan un mayor número y diversidad de microorganismos (224). Es más, los animales *Fut7*^{-/-} son más susceptibles a infección (196). El papel de la microbiota en granulopoiesis descrito durante los últimos años (223) nos permite proponer un modelo de eliminación de neutrófilos en animales *Fut7*^{-/-}. En este escenario, los neutrófilos WT ó CXCR4 atraídos por señales derivadas de la microbiota infiltrarían estos órganos e inducirían una reducción de la inflamación de los animales *Fut7*^{-/-} tras su eliminación en este tejido o en otros (regulación remota del nicho). De forma opuesta, los neutrófilos que no infiltran correctamente en estos tejidos (*Cxcr2*^{-/-} y *CD18*^{-/-}) no pueden ser eliminados eficientemente, por lo que los niveles de neutrófilos y HSPC en la sangre del animal *Fut7*^{-/-} permanecen elevados, emulando una condición crónica inflamatoria.

Regulación circadiana del sistema inmune y del nicho hematopoyético

Nuestros resultados también necesitan ponerse en el contexto de la regulación circadiana del sistema inmune (187). Hemos demostrado que existe un *clearance* preferencial de neutrófilos hacia órganos concretos a ZT13 (Figura 33). Adicionalmente, existen estudios que han confirmado el componente cíclico en la producción y secreción de citoquinas inflamatorias en el organismo (174). Enfermedades como el asma, el infarto de miocardio y la artritis reumatoide, han sido relacionadas con el grado de activación de células efectoras del sistema inmune innato y un mayor infiltrado de leucocitos a los tejidos diana en determinados momentos del día (174). Por ello, la regulación temporal del *clearance* de neutrófilos podría resultar importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, donde existe un elevado reclutamiento de neutrófilos y una necesidad constante de eliminación de estas células. En relación a esto se ha demostrado un mayor grado de obesidad en animales cuyos monocitos no presentan oscilaciones circadianas (179).

Consideraciones finales

Hemos observado que la eliminación de neutrófilos en médula ósea induce una disminución del tamaño del nicho y de su función (Figura 12). Por el contrario, la eliminación de neutrófilos fuera de médula ósea induce un aumento del número de células relacionadas con nicho y de los niveles de

CXCL12 (Figura 9). En conjunto, demostramos que la eliminación de neutrófilos en médula ósea determina las oscilaciones circadianas y homeostáticas de progenitores hematopoyéticos mediante el efecto directo sobre el nicho hematopoyético (Figura 21).

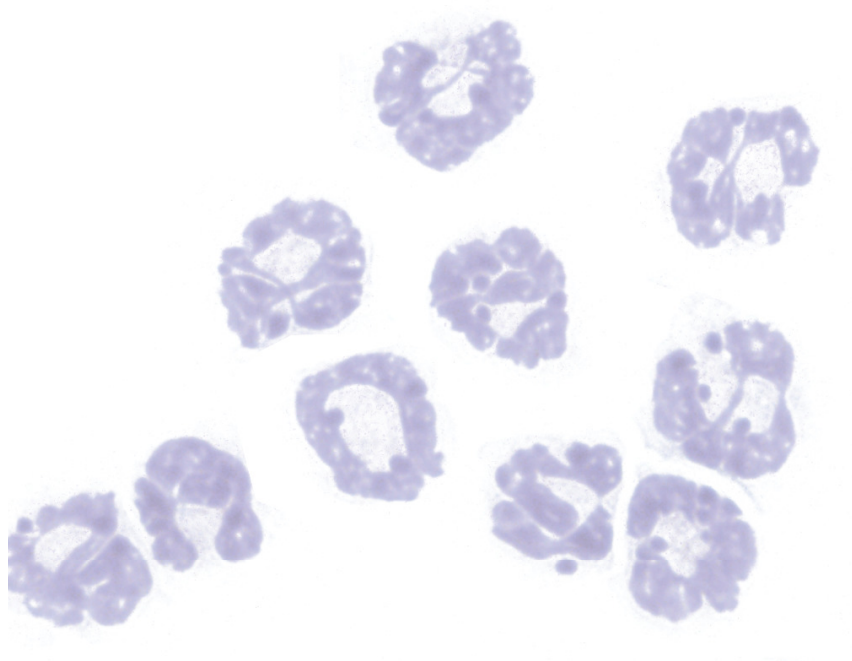
Aprovechándonos del animal deficiente en *Fut7*, hemos analizado la respuesta y regulación del nicho hematopoyético imitando una condición inflamatoria, donde los niveles de neutrófilos y HSPC en circulación están elevados. Este modelo nos ha permitido además analizar órganos en los que la eliminación de neutrófilos no es eficiente debido a la ausencia específica de pares receptor-ligando. Estos resultados nos han permitido proponer el siguiente modelo (Figura 38): en la piel y el intestino de animales con deficiencias en el tráfico de neutrófilos la inhibición del *clearance* endógeno podría promover un aumento de G-CSF sistémico (Figura 36B) y consecuentemente, de los niveles de HSPC en circulación (Figura 24). En condiciones fisiológicas, la eliminación de neutrófilos en estos órganos regula los niveles de G-CSF y CXCL12. Por tanto, la eliminación de neutrófilos en órganos periféricos normaliza la actividad del nicho hematopoyético mediante señales que se generan en periferia y que se integran vía bazo (Figura 28) y médula ósea. La dependencia de pares selectina-ligando específicos para la eliminación de neutrófilos en cada órgano, implica que la modulación del nicho hematopoyético puede ser dirigida hacia órganos particulares, contribuyendo a la recuperación del sistema hematopoyético (Figura 25B) o bien forzando la movilización de HSPC (Figura 18), lo cual puede tener potencial interés clínico.

Además de nuestras observaciones, la eliminación de neutrófilos en el organismo podría estar relacionada con la modulación de los niveles de colesterol. Uno de los efectos descritos para los glucocorticoides y las estatinas es el aumento del proceso de eferocitosis en macrófagos (225). Por otro lado, ratones WT transplantados con la médula ósea de animales *Cxcr2*^{-/-}-cuyos neutrófilos no envejecen y no son eliminados normalmente- presentan una disminución drástica del tejido adiposo blanco subcutáneo y de su peso corporal. La eliminación de neutrófilos en un escenario de inflamación (hipercolesterolemia) o en condiciones basales, podría suponer un nuevo mecanismo para la regulación del colesterol en el organismo. Finalmente el repertorio de señales que los neutrófilos generan durante su envejecimiento y su eliminación podrían modular directamente la respuesta del nicho hematopoyético. En el futuro conocer estas señales así como las células responsables de su interpretación, nos permitirá modular la respuesta del sistema inmune y hematopoyético.

El trabajo de esta tesis describe la eliminación de neutrófilos como mecanismo regulador de la homeostasis del nicho hematopoyético y del tráfico de HSPC. Durante los próximos meses y antes de iniciar mis estudios posdoctorales analizaremos el perfil de expresión de genes relacionados con la actividad del nicho hematopoyético regulados en respuesta al *clearance* de neutrófilos. Además, analizaremos las poblaciones de células que producen CXCL12 fuera de médula ósea y comprobaremos si el *clearance* de neutrófilos tiene un impacto en la función del nicho hematopoyético de células endoteliales o mesenquimales. Por último, analizaremos las señales intrínsecas que determinan el envejecimiento de neutrófilos mediante los modelos animales que carecen de genes centrales del reloj molecular.

En resumen, nuestro trabajo demuestra que la eliminación diaria de células con potencial tóxico y frágil integridad, preserva la homeostasis en el organismo.

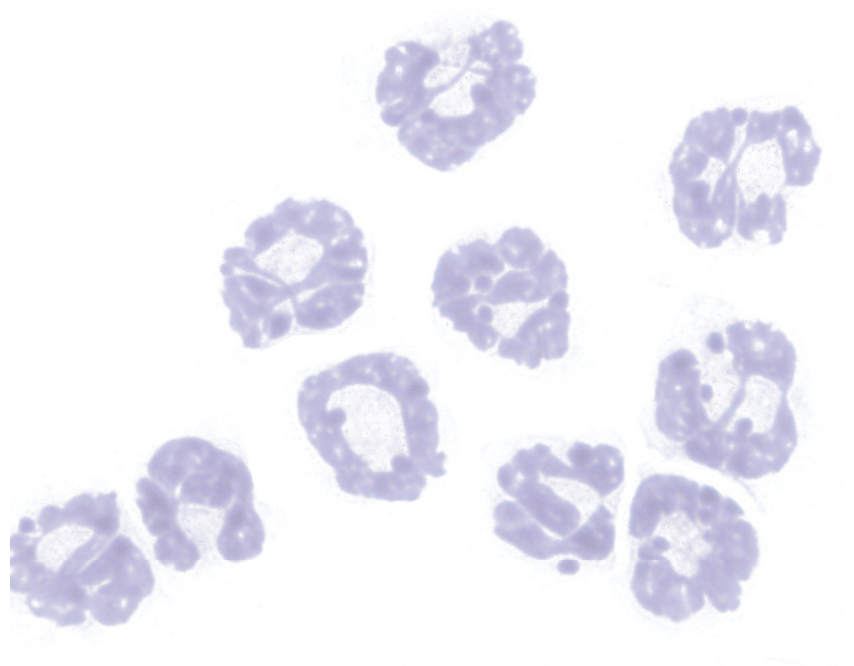
Conclusiones



Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Los neutrófilos sufren un proceso de envejecimiento en circulación, caracterizado por el aumento de la expresión de CXCR4 y la pérdida de CD62L. Hemos identificado otros marcadores que cambian durante el proceso de envejecimiento de neutrófilos.
2. Los niveles de neutrófilos en sangre fluctúan de forma circadiana, con valores máximos a ZT5 y mínimos a ZT13.
3. La eliminación espontánea o *clearance* de neutrófilos ocurre preferencialmente al inicio del periodo de actividad (ZT13) en múltiples tejidos.
4. El *clearance* de neutrófilos en médula ósea está relacionado con su fagocitosis por macrófagos residentes y la activación de los receptores nucleares LXR.
5. La eliminación de neutrófilos en médula ósea disminuye la capacidad retentiva del nicho hematopoyético, induciendo una reducción en el número de células CAR y producción de CXCL12, lo que favorece la movilización homeostática de HSPC al torrente sanguíneo.
6. En condiciones basales, los neutrófilos se eliminan de forma ubicua en el organismo.
7. El tráfico de neutrófilos en ausencia de inflamación está mediado por pares receptores-ligando específicos y es fundamental para la correcta eliminación de estos leucocitos.
8. La eliminación de neutrófilos en piel, intestino y músculo esquelético es dependiente de ligandos de selectinas.
9. El *clearance* de neutrófilos en periferia modula el nicho hematopoyético por señales remotas. Este control requiere de macrófagos residentes CD169+ y de la presencia del bazo.
10. La presencia de células que producen CXCL12 en tejidos periféricos sugiere la existencia de nichos hematopoyéticos en otros órganos que pueden ser diana de la actividad de neutrófilos eliminados.

Materialles y Métodos



1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales usados en los experimentos fueron indistintamente machos y hembras de 6-12 semanas de edad con fondo genético C57BL/6. Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; agua y dieta estándar fueron suministrados ad libitum. Los ratones fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) en la Unidad del Animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Algunos de los experimentos se realizaron en animales alojados en estatus de cuarentena, en cuyo caso aparece reflejado específicamente en el pie de figura. Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos del Animalario y del Comité de Ética del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. El listado de animales de experimentación se detalla en la siguiente **Tabla 1**:

Mote	Nombre de la cepa	Mutación	Fenotipo	Referencia
<i>Fut7</i> ^{-/-}	B6.129S- <i>Fut7</i> ^{tm1Jbl}	Knock-out	Deficiente en ligando de selectina (fucosiltransferasa 7). Neutrofilia	196
<i>Sele/Selp</i> ^{-/-} (PEdKO)	B6.129S- <i>Sele</i> ^{tm1Hyn} <i>Selp</i> ^{tm1Hyn}	Knock-out	Deficiente en selectinas endoteliales. Neutrofilia.	195
<i>Nhr1h3</i> / <i>Nhr1h2</i> ^{-/-} (LXRdKO)	B6.129S- <i>Nr1h3</i> ^{tm1Djm} <i>Nr1h2</i> ^{tm1Djm}	Knock-out	Deficiente en receptores nucleares LXRαβ. Fagocitosis ineficiente.	226
<i>Cxcr4</i> ^{l/f}	B6.129P- <i>Cxcr4</i> ^{tm2Yzo}	Knock-in	La descendencia del cruce con animales <i>LysM</i> ^{Cre} (MR4) ó <i>hMRP8-Gfp</i> ^{Cre} (NR4) genera ratones con neutrófilos deficientes en el receptor CXCR4. Migración a M.O reducida.	227
<i>LysM</i> ^{Cre}	B6.129P- <i>Lyzs</i> ^{tm1(cre)lfo}	Knock-in	Recombinasa Cre específica del linaje mieloide	202
<i>LysM</i> ^{Gfp}	B6.129P- <i>Ly2</i> ^{tm1(EGFP)1.1Graf/Mmmh}	Knock-in	Recombinasa Cre. Expresión de GFP en el linaje mieloide	228
<i>hMRP8-Gfp</i> ^{Cre}	B6.Cg-Tg(S100A8-cre, -EGFP)1Ilw	Transgén	Recombinasa Cre específica de neutrófilos. Expresión de GFP en neutrófilos.	229
<i>Gfp</i>	B6.Tg(ACTB-EGFP)10sb	Transgén	Expresión de GFP en células que expresen β-actina	230
<i>DsRed</i>	B6.Cg-Tg(ACTB-DsRed *MST)1Nagy	Transgén	Expresión de DsRed en células que expresen β-actina	231
<i>Cxcl12</i> ^{Gfp}	B6.129P- <i>Cxcl12</i> ^{tm2Tng}	Knock-in	Expresión de GFP en células que expresen CXCL12	142
<i>Nestin</i> ^{Gfp}	B6.Tg(Nes-EGFP)33Enik	Transgén	Expresión de GFP en células que expresen nestina	232
<i>Cxcr2</i> ^{-/-}	B6.129(C)- <i>Il8rb</i> ^{tm1Mwm}	Knock-out	Neutrófilos deficientes en CXCR2. Migración a periferia reducida.	233
<i>Mcl1</i> ^{fl/y}	B6.129Mcl1 ^{tm35jk}	Knock-in	La descendencia del cruce con animales <i>hMRP8-Gfp Cre</i> genera ratones deficientes en el gen antiapoptótico Mcl1. Neutropenia.	234
<i>CD18</i> ^{-/-}	B6.129Itgam ^{tm1Myd}	Knock-out	Neutrófilos deficientes en integrinas β2. Extravasación reducida. Neutrofilia.	235
<i>CD169-DTR</i>	B6.129Siglec1 ^{tm1(HBEFG)Mtko}	Knock-in	El tratamiento con DT induce la eliminación de macrófagos que expresan CD169.	149

Tabla 1: Ratones utilizados durante la experimentación. M.O, médula ósea.

2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE NEUTRÓFILOS DE MÉDULA ÓSEA Y SANGRE

Neutrófilos de médula ósea

Las células de médula ósea procedentes de fémures y tibias fueron extraídas mediante perfusión a través del conducto medular con solución salina HBSS 1x (Hank's balanced salt solution) y 2 mM de EDTA. Los neutrófilos fueron purificados con Percoll (GE Healthcare, España) preparado al 62% con HBSS 1x. A continuación, los eritrocitos presentes en la preparación fueron lisados con solución hipotónica (KH_4Cl 0,15M/ KHCO_3 0,01M/EDTA 0,01M) en agua destilada y el pH fue ajustado a un valor de 7,4. La pureza de los neutrófilos obtenidos fue determinada mediante citometría de flujo por la expresión del marcador Ly6G, específico de este tipo celular. Rutinariamente, la pureza de neutrófilos que se obtuvo empleando este protocolo fue $\geq 90\%$.

Para inducir “envejecimiento” de neutrófilos *in vitro* estos se cultivaron de 6 a 18 horas en condiciones de esterilidad en medio completo RPMI suplementado con 10% de FBS y antibióticos penicilina/estreptomicina (P/S) al 1% a 37°C (110). La adquisición del fenotipo envejecido definido por la expresión de los marcadores CXCR4^{HI} y CD62L^{LO}, fue determinada mediante citometría de flujo.

Neutrófilos de sangre

Para la preparación de neutrófilos procedentes de sangre ratones de fenotipo silvestre o wild-type (WT) fueron inyectados intravenosamente con anticuerpos bloqueantes de selectinas endoteliales P y E (clones RB40 y 9A9, respectivamente. Ver (Tabla 5)) para enriquecer el número de neutrófilos circulantes. Ratones PE-dKO fueron también utilizados para la purificación de neutrófilos. En este caso, la sangre se extrajo mediante sangrado maxilar y/o retroorbital en tubos recubiertos con EDTA para evitar la coagulación. Posteriormente, la sangre fue incubada en metilcelulosa preparada al 2% en PBS 1x (phosphate-buffered saline) estéril durante 40 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes enriquecidos en leucocitos fueron centrifugados durante 5 minutos a 4°C de temperatura y 160 g, y lisados en solución hipotónica. A continuación, los leucocitos totales fueron incubados con anticuerpos anti- CD3, CD4, B220, CD71, CD115 y Siglec-F ver (Tabla 2) y las células negativas para estos marcadores fueron separadas por citometría de flujo en los equipos MoFlo Legacy (Beckman Coulter) y FACS Aria II (BD Biosciences). La pureza final de neutrófilos obtenida fue $\geq 95\%$.

Alternativamente, leucocitos totales de sangre fueron incubados con anticuerpos biotinilados anti-Ter119, B220, CD3, CD115, CD117, CD4, CD8, CD49b y F4/80. A continuación, el exceso de anticuerpo se eliminó mediante lavado con PBS con 2 mM EDTA y 0,5% FBS (solución PEB, en adelante) y centrifugación (5 minutos a 4°C de temperatura y 160 g). A continuación, las células fueron incubadas con estreptavidina conjugada a bolas magnéticas (BD Biosciences) durante 30 minutos y resuspendidas en solución PEB para su unión a un imán magnético (BD Biosciences). La fracción no adherida al

Anticuerpo	Clon	Compañía
CD3ε-biotina	145-2C11	BD
CD11b-biotina	M1/70	BD
B220-biotina	RA3-6B2	BD
Gr1-biotina	RB6-8C5	BD
CD45-biotina	30-F11	BD
Ter119-biotina	Ter119	BD
CD4-biotina	GK1.5	eBioscience
CD8a-biotina	53-6.7	eBioscience
CD115-biotina	AFS98	eBioscience
F4/80-biotina	BM8	eBioscience
CD117-biotina	2B8	eBioscience
CD49b-biotina	DX5	eBioscience
CD49d-biotina	PS/2	eBioscience
CD31-biotina	390	eBioscience
CD11b-FITC	M1/70	BD
CD115-PE	AFS98	eBioscience
CD31-APC	390	eBioscience
CD62L-APC	MEL-14	BD
CD62L-PE	MEL-14	BD
CXCR4-PE	2B11	eBioscience
F4/80-APC	A3.1	AbDSerotec
F4/80-APC	BM8	eBioscience
Siglec-F-PE	E50-2440	BD
Gr1-FITC	RB6-8C5	eBioscience
Sca-1-FITC	D7	eBioscience
c-Kit Pe-Cy7	2B8	eBioscience
Thy1.2-APC	53-2.1	eBioscience
FcyR-PE	93	eBioscience
Flk2-PE	A2F10	eBioscience
CXCR2-PE	242216	R&D
CD47-FITC	MIAP301	BD
CD45.2 APC-Cy7	104	eBioscience

Estreptavidinas	Compañía
PE	eBioscience
eF-450	eBioscience
APC-eF780	eBioscience
Otros	Compañía
AnexinaV-PE	BD

Anticuerpos purificados	Compañía	Tipo de marcaje
Ly6G	BioXcell	Biotina
Ter119	BioXcell	Biotina
CD11b	BioXcell	Biotina
CD3ε	BioXcell	Biotina
CD11b	BioXcell	Biotina
B220	BioXcell	Biotina

Tablas 2: Anticuerpos, estreptavidinas y otras sondas fluorescentes utilizadas para la identificación de células mediante citometría de flujo. Los fluorocromos acoplados a los anticuerpos de esta tabla se corresponden con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofococianina (APC), y los tándems alofococianina-cianina 7 (APC-Cy7) y ficoeritrina-cianina 7 (PE-Cy7).

imán fue recogida y resuspendida en 1 ml de PEB. Este paso se repitió secuencialmente 3 veces. Las células no adheridas al imán al final del proceso fueron recogidas y analizadas por citometría de flujo. Se obtuvieron unas purezas del $90 \pm 2\%$ en donantes WT y del $95 \pm 1\%$ en donantes PEdKO mediante este protocolo.

3. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES MIELOIDES Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Para determinar la pureza de las células obtenidas o cuantificar las poblaciones de interés, las células fueron incubadas con el/los anticuerpo(s) específicos durante 15 minutos a 4°C y protegidas de la luz. El exceso de anticuerpo fue eliminado mediante lavado de las células con 1 ml de solución PEB y centrifugación durante 5 minutos a 4°C.

En los marcajes en los que se emplearon anticuerpos biotinilados se procedió a un lavado con PEB tras la incubación. A continuación, se procedió a la incubación con estreptavidinas conjugadas a fluorocromos durante 15 minutos a 4°C y protegidas de la luz. Tras el lavado del segundo marcaje, las células fueron resuspendidas en solución PEB con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración final 1×10^{-5} mg/ml y analizadas en el citómetro. Los análisis fueron realizados en un citómetro FACS Canto o LSR Fortessa II equipados con el software de adquisición DIVA (BD Biosciences). Los datos obtenidos se analizaron posteriormente utilizando software DIVA o FlowJo (TreeStar). Las células DAPI+ son células necróticas y fueron excluidas de los análisis en todos los experimentos. Los anticuerpos conjugados a fluorocromo, biotinilados, las estreptavidinas, así como otras sondas utilizadas para citometría de flujo se encuentran indicadas en la [Tabla 2](#).

Para la identificación de células madre y progenitores hematopoyéticos (del inglés, hematopoietic stem and progenitor cells o HSPC) se incubaron las suspensiones de médula ósea con anticuerpos que reconocen antígenos de linajes hematopoyéticos diferenciados: anti-CD3, B220, Ter11, Mac-1 y Gr1 (de ahora en adelante marcadores de linaje o LIN). A continuación, incubamos con anticuerpos anti-Sca-1 y anti-c-Kit. La población enriquecida en HSC se identificó como LIN^{NEG}Sca1⁺c-Kit⁺ (LSK), mientras que los progenitores mieloides o MPs se identificaron como LIN^{NEG}Sca1^{NEG}c-Kit⁺. Los precursores más maduros o “short-term” (ST-HSC), fueron identificados por la expresión de los anteriores marcadores y por un perfil Thy1.2^{LO}Flk2⁺, mientras que los más primitivos o “long-term” (LT-HSC) se identifican como LIN^{NEG}Sca1⁺c-Kit⁺Thy1.2^{LO}Flk2^{NEG}. Para la detección de HSPC en circulación, se purificó la fracción mononuclear procedente de 250 µl de sangre mediante un gradiente (Lympholyte) y se incubó con los anticuerpos mencionados por citometría de flujo.

Digestión de tejidos para análisis por citometría de flujo

En el análisis de poblaciones mieloides las células obtenidas de médula ósea, bazo, sangre, pulmón, hígado, piel, intestino grueso (colon), músculo esquelético y grasa epididimal, se marcaron con anticuerpos biotinilados o directamente conjugados con fluorocromos. Previo al marcaje de células, los tejidos procedentes de piel, intestino grueso, músculo esquelético y grasa, fueron digeridos en HBSS 1x con liberasa 0,02 mg/ml (1U/ml) y DNAsa I (10^{-3} U/ml) durante 30 minutos a 2 horas a 37°C.

Para la purificación de neutrófilos de hígado o músculo esquelético, las células procedentes de la digestión fueron purificadas mediante Percoll al 36% y 40%, respectivamente. Suspensiones celulares de médula ósea fueron incubadas con anticuerpos anti-Gr1, CD115 y F4/80 para la identificación de macrófagos.

La identificación de células que expresan CXCL12 se realizó en tejidos de ratones *Cxcl12^{Gfp}* previamente digeridos como se ha indicado anteriormente. Las células procedentes de la digestión se incubaron con anticuerpos biotinilados anti-Ter119, CD31 y CD45. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante lavado con solución PEB y centrifugación durante 5 minutos a 4°C de temperatura y 160g, y a continuación las células se incubaron con estreptavidina conjugada con DyLight649. En médula ósea, la intensidad de fluorescencia en el canal de la GFP fue utilizado para discriminar células productoras de CXCL12 (CXCL12-abundant reticular cells o CAR, CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{HI}) de osteoblastos (CD45^{NEG}Ter119^{NEG}CD31^{NEG}GFP^{LOW}). En el resto de tejidos no se encontraron niveles intermedios de GFP, por lo cual las poblaciones fueron clasificadas en dos grupos: endoteliales (CD31⁺GFP⁺ y CD31⁺GFP^{NEG}) y no endoteliales (CD31^{NEG}GFP⁺ y CD31^{NEG}GFP^{NEG}). En estos experimentos las células se marcaron con anticuerpos anti-CD45 y Ter119 biotinilados, junto a CD31-APC y estreptavidina conjugada con APC-Cy7.

4. RECONSTITUCIÓN HEMATOPOYÉTICA POR TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA

Para reconstituir el sistema hematopoyético de ratones usamos células derivadas tanto de sangre como de medula ósea. Volúmenes iguales de sangre procedente de donantes de variantes alélicas CD45.1 y CD45.2 (400

μl) fueron suplementados con 10^6 células de médula ósea procedente de un donante CD45.2 *Tg-DsRed*. La suspensión celular obtenida se inyectó por vía intravenosa en ratones recipientes. Como animales recipientes usamos ratones CD45.2 *Tg-DsRed* de entre 8 y 12 semanas letalmente irradiados con dos dosis de 6,5 greys (Gy) separadas 3 horas entre sí (dosis total 13 Gy). Los ratones recipientes fueron sangrados cada 4 semanas para controlar la eficiencia y frecuencias de reconstitución por citometría de flujo hasta la semana 16. La actividad reconstitutiva de los grupos experimentales se evaluó comparando el número de leucocitos DsRed^{NEG}CD45.1⁺ frente a leucocitos DsRed^{NEG}CD45.2⁺ en la sangre de los ratones recipientes. En experimentos adicionales utilizamos animales WT *Tg-DsRed* y *CD18^{-/-}* como donantes de médula ósea, donde una mezcla 1:1 de ambas médulas (2×10^6 células nucleadas totales, 10^6 células de cada donante) fue transferida en recipientes WT CD45.2 irradiados letalmente.

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para el análisis de los niveles de RNA mensajeros codificantes para genes de interés en las distintas poblaciones celulares se realizaron extracciones de RNA mensajero con el kit RNA Extraction RNeasy Plus Mini- o Micro-kit (Qia-gen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente 1 μg del RNA obtenido se retrotranscribió a cDNA con los reactivos del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). A continuación, el cDNA obtenido se utilizó para amplificar por RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) con SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todos los ensayos de RT-qPCR se realizaron en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y se analizaron con los software SDS (Applied Biosystems) y Biogazelle qbase PLUS (Biogazelle). Los resultados obtenidos se normalizaron a la expresión de Hprt y 36b4 en cada muestra. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la [Tabla 3](#).

Oligonucleótidos	Secuencias 5' -> 3'
Cxcl12_Fw	CGCCAAGGTCGTCGCCG
_Rv	TTGGCTCTGGCGATGTGGC
Mertk_Fw	GAGGACTGCTTGGATGAACTGTA
_Rv	AGGTGGGTCGATCCAAGG
Abca1_Fw	GGTTTGGAGATGGTTATACAATAGTTGT
_Rv	CCCGGAAACGCAAGTCC
Hprt_Fw	CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA
_Rv	CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA
36b4_Fw	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
_Rv	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT
C1qb_Fw	CAGGGATAAAGGGGGAGAAA
_Rv	GGACCCTTAGGGCCAACCTT
LXRα_Fw	CAACAGTGTAACAGGCGCT
_Rv	TGCAATGGGCCAAGGC
LXRβ_Fw	CCCCACAAGTTCTCTGGACACT
_Rv	TGACGTGGCGGAGGTACTG
Colα1_Fw	TGTGTGCGATGACGTGCAAT
_Rv	GGGTCCCTCGACTCCTACA
Osteocalcin_Fw	ACCCTGGCTGCGCTCTGTCTCT
_Rv	GATGCGTTTGTAGGCGGTCTTCA
VE-Cadherin_Fw	GTTCAAGTTTGCCCTGAAGAA
_Rv	GTGATGTTGGCGGTGTTGT
Csf3_Fw	TCATTCTCTCCACTCCG
_Rv	CTTGGTATTTACCATCTCC

Tabla 3: Secuencias de oligonucleótidos empleadas en los ensayos de RT-qPCR.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELISA Y WESTERN BLOT

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para determinar los niveles de CXCL12 en médula ósea, el fluido extracelular procedente de la médula (o BMEF, del inglés *Bone Marrow Extracellular Fluid*) de 2 fémures fue extraído mediante perfusión con 1 ml de PBS. Las muestras se centrifugaron a 4°C y 300 g durante 8 minutos y el sobrenadante (BMEF) fue recogido. Los BMEFs se diluyeron 1:5 en PBS 1x para su utilización.

Para la cuantificación de los niveles de G-CSF en plasma, se sangraron animales en tubos recubiertos con EDTA. El plasma fue diluido 1:4 en PBS para su utilización.

Los análisis se realizaron con kits comerciales disponibles para la cuantificación de CXCL12 y G-CSF (R&D Systems). Brevemente, placas de 96 pocis

llos fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente disuelto en solución de alta unión (NaHCO_3 0.1M en agua destilada, pH=8,6-8,9) durante 18 horas a 4°C. Los pocillos fueron lavados con PBS-Tween-20, antes del bloqueo durante 1 hora con PBS/1% BSA (bovine serum albumin) /5% sucrosa/0,05% NaN_3 . Posteriormente las muestras de plasma o BME-Fs se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el lavado del bloqueo, las muestras se incubaron durante 2 horas con los anticuerpos biotinilados correspondientes y se lavaron a continuación. Las muestras se incubaron con estreptavidina-HRP (*horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano) diluida a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución 0,05% Tween-20 en TBS (*tris-buffered saline*) con 0,1% BSA. Tras los lavados se añadió el sustrato colorimétrico TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma) y se incubó durante 25 minutos con las muestras. La reacción fue detenida con la adición de HCl 1M. La absorbancia fue medida en un lector (BioRad xMark Microplate Spectrophotometer) a 450 nm y los valores obtenidos a una absorbancia de 570 nm sustraídos antes del análisis de los anteriores. Rectas patrón obtenidas con las citoquinas recombinantes respectivas se analizaron en paralelo para el cálculo de los valores de las citoquinas ensayadas. A continuación, se incluye una tabla resumen (Tabla 4) con las citoquinas recombinantes y los anticuerpos para su detección mediante ELISA.

Citoquina recombinante (compañía)	Anticuerpos	Compañía
CXCL12 (Peprotech)	MAB350/BAF310	R&D
G-CSF (Peprotech)	MAB414/BAF414	R&D

Tabla 4: Citoquinas recombinantes y anticuerpos utilizados para la detección por ELISA.

Análisis de la expresión de proteína por western blot

Para determinar los niveles de expresión de las proteínas MCL1 y caspasa 3 segmentada (*cleaved caspase 3* ó cC3) se purificaron neutrófilos de médula ósea y de sangre como se ha indicado previamente. La apoptosis de neutrófilos derivados de médula ósea se indujo incubando las células con 20 μM de R-(R)-Roscovitina (A.G. Scientific) durante 4 horas en RPMI con 10% FBS. Las poblaciones de neutrófilos $\text{Ly6G}^+\text{CD62L}^{\text{LO}}$ y $\text{Ly6G}^+\text{CD62L}^{\text{HI}}$ fueron purificadas por citometría de flujo y sorting o selección de células procedentes de la sangre de animales PEdKO tratados con AMD3100 (Tocris).

Posteriormente, las células fueron lisadas en tampón RIPA que contenía 50 mM Tris-Hcl pH=8,0; /150mM NaCl/1% Triton X-100/0,5%deoxycolato de sodio/0,1% SDS/1mM PMSF (Sigma) y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma). Las proteínas procedentes de 3×10^5 células fueron separadas por tamaño

por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Tras la electroforesis, el gel se transfirió a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas 18 horas con anticuerpos contra MCL-1 (clon S-19, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:100; contra cC3 (residuo Asp175) a una dilución 1:1000 (clon 5A1E, Cell Signaling Technology). A continuación, se incubó con anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa a una dilución 1:300 (GE Healthcare Life Sciences). Las membranas fueron visualizadas mediante el sistema de quimioluminiscencia Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore). Para la detección de ERK1/2, las membranas se lavaron con solución para la eliminación del anticuerpo unido e incubadas de nuevo con anticuerpos para la detección de MAPK fosfo-44/p42 (ERK1/2, clon 137F5, Cell Signaling Technology) a una dilución 1:1000.

7. CULTIVOS CELULARES

Cultivo de progenitores hematopoyéticos ó CFU-C

La cuantificación de progenitores hematopoyéticos en sangre, médula ósea, bazo, hígado y pulmón se realizó mediante ensayos clonogénicos de unidades formadoras de colonias en cultivo o CFU-C (del inglés, *colony-forming units in culture*) en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

CFU-C en sangre

Para la purificación de progenitores hematopoyéticos se utilizaron 100 µl de sangre separados por gradiente de densidad en Lympholyte (Cedarlane Labs). La sangre fue resuspendida en 2 ml de medio RPMI con 2 mM de EDTA y 1%P/S y cuidadosamente transferida sobre 2 ml de Lympholyte sin que ambas fases se mezclaran. A continuación, se centrifugaron a temperatura ambiente sin freno y sin aceleración durante 25 minutos. La fracción mononuclear se lavó dos veces en medio y se sembró en medio semisólido. Este medio consiste en: 1,25% metilcelulosa, 30% FBS, 1% BSA desionizado, 10⁻⁴M 2-mercaptoetanol y medios condicionados en una concentración 12,7% v/v de las líneas celulares WEHI, HM-5 y BHK/MKL. Estos medios son la fuente de las citoquinas IL-3, GM-CSF y SCF, respectivamente, necesarias para el crecimiento de progenitores hematopoyéticos. El número de CFU-C se representó por volumen (ml) de sangre.

CFU-C en bazo

Los bazos se disgregaron sobre filtros de nylon de 100 μm de poro en RPMI con 1% de P/S. Posteriormente, se realizó un lavado con medio completo (RPMI/10%FBS) y la suspensión celular se centrifugó a temperatura ambiente 5 minutos a 160 g. Las células fueron resuspendidas en medio RPMI con antibióticos P/S y sólo el 1% de la suspensión celular se plaqueó en metilcelulosa para evitar saturar el cultivo. El número total de CFU-C se refirió al presente en la totalidad del bazo.

CFU-C en hígado

Los hígados se procesaron como se ha descrito anteriormente para los bazos. Un 5% del hígado total fue cargado sobre un gradiente de Percoll preparado al 36% para la eliminación completa de los hepatocitos. La fracción celular resultante de la purificación fue lavada en RPMI más 1% P/S y plaqueada en metilcelulosa. El número total de CFU-C se representó con respecto al total presente en la totalidad del hígado.

CFU-C en médula ósea

La médula ósea proveniente de los 2 fémures se extrajo por perfusión con 1 ml de RPMI más 1%P/S. A continuación, se procedió a la lisis de eritrocitos con ácido acético al 6% en agua y se evaluó la celularidad con azul de tripán. El volumen de la suspensión celular de médula ósea correspondiente a 10.000 células fue plaqueado en metilcelulosa. El número de CFU-C se representó con respecto al total presente en los dos fémures.

En todos los casos, las células fueron sembradas en duplicados en placas de cultivo de 35 mm (NUNC) e incubadas a 37°C en 5% de CO₂. La cuantificación de las CFU-C se realizó 6 ó 7 días después del sembrado utilizando un microscopio invertido. En el caso de la cuantificación de las colonias procedentes de animales transgénicos DsRed ó Gfp las colonias fueron contadas a día 8 ó 9 para una mejor visualización de la fluorescencia endógena de las colonias.

8. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en ratones de 6-12 semanas del mismo sexo y edad. Los ratones fueron previamente anestesiados con ketamina 7,5% y xilacina 5% (10 $\mu\text{l/g}$).

Parabiosis

La parabiosis es el procedimiento experimental por el cual 2 organismos son conectados quirúrgicamente para permitir la anastomosis y compartición del sistema circulatorio. La generación de ratones parabiontes se realizó de acuerdo al protocolo previamente establecido (37). Brevemente, se rasuró el dorso lateral de los animales y se hicieron incisiones en la piel desde el olecranon hasta la articulación de la rodilla de cada ratón (Figura Suplementaria Métodos 1). La fascia subcutánea fue retirada para crear una superficie de aproximadamente 0,5 cm de piel libre. El olecranon y la articulación de la rodilla fueron cosidas con una sutura de polipropileno (calibre 5.0). La piel dorsal y ventral se cosieron con puntos continuos con sutura de seda (calibre 7.0). Los parabiontes recibieron una dosis única de flunixin-meglumina como antiin-

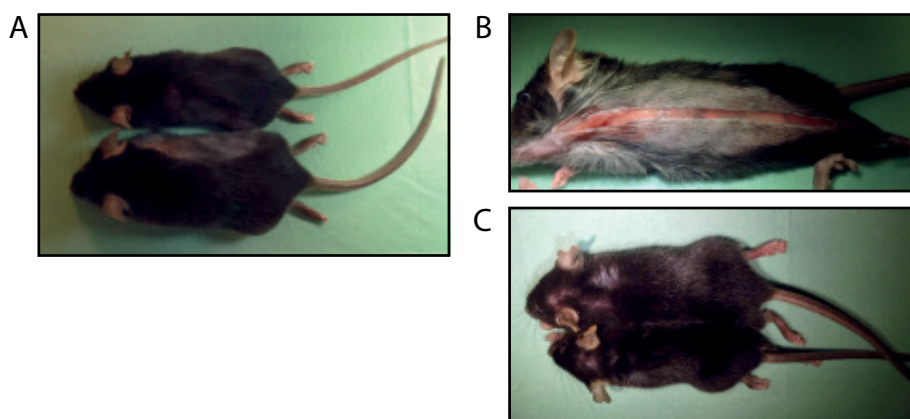


Figura Suplementaria Métodos 1: Procedimiento quirúrgico de parabiosis.

A) Preparación de los animales tras la depilación del área donde se realiza la incisión. B) Incisión desde el olecranon hasta la articulación de la rodilla. C) Los parabiontes quedan unidos por la piel tras la sutura de la zona ventral y dorsal.

flamatorio (1 mg/kg, subcutáneo) y se dejaron recuperar en cabina de temperatura y pO_2 controlados tras la operación. Un mes después de la cirugía, se extrajeron muestras de sangre y otros tejidos de cada pareja para el análisis de los niveles de leucocitos y de progenitores hematopoyéticos.

Esplenectomías

Para la extracción quirúrgica del bazo realizamos una pequeña incisión dorsoventral por debajo del diafragma, ligeramente inclinada hacia el eje de la columna vertebral del animal donde el bazo se encuentra localizado. La incisión a esta altura permite la extracción y exposición del bazo, cuyos vasos aferente y eferente se ligan con sutura de seda (calibre 7.0). Una vez ligados ambos vasos se cortan los extremos proximales para liberar el órgano. Finalmente, el paquete muscular y la piel se sellan mediante una grapa. Un mes después de la cirugía, se analizaron los niveles de leucocitos y de progenitores hematopoyéticos en los animales operados.

Tras la cirugía las parejas de parabiontes y los animales esplenectomizados permanecieron en cámaras de recuperación (Individually ventilated Cages IVC Recovery Unit, Tecniplast) con temperatura constante a 37°C y ventilación 18 horas, antes de ser devueltos a racks de estabulación convencionales.

9 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Detección de neutrófilos por inmunofluorescencia

Para la detección de neutrófilos se sacrificaron animales WT ó *LysM^{Gfp}* mediante asfixia con CO₂ y se perfundieron con solución PEB. Se utilizaron muestras de tejidos fijadas en PFA 4% durante 18 horas a 4°C y congeladas rápidamente en OCT Compound (Tissue Tek) en nitrógeno líquido, lo que permite preservar la estructura del tejido. Los tejidos se cortaron a 5 µm en criostato (Leica CM1850) y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Para la tinción por inmunofluorescencia, las muestras fueron bloqueadas durante 1 hora en PBS con 10% BSA y 2% suero de cabra. A continuación, las muestras fueron incubadas con anticuerpo de conejo anti-ratón para el antígeno laminina (dilución 1:300, Sigma) para la detección de la membrana basal y Ly6G-biotinilado (dilución 1:50), durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar las muestras en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo (3 lavados de 5 minutos), se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa-Fluor635 (Life Technologies) y estreptavidina conjugada con Alexa546 (Invitrogen), ambos diluidos 1:500. Las preparaciones fueron lavadas con PBS e incubadas con DAPI (1:1000) para la detección de núcleos. Finalmente, las muestras fueron montadas con Mowiol (Sigma).

Inmunofluorescencia de macrófagos fagocíticos

Para identificar los macrófagos que fagocitan neutrófilos en médula ósea, se utilizaron animales que habían permanecido en parabiosis durante 1 mes (parejas WT: *Tg-DsRed*, en los que se analizó el animal WT no fluorescente y parejas *Fut7^{-/-}DsRed:Fut7^{-/-}* y *Tg-DsRed:Fut7^{-/-}*). Mediante citometría de flujo se seleccionaron las poblaciones de macrófagos Gr1^{NEG}F4/80⁺DsRed⁺ y DsRed^{NEG}. De esta forma, la presencia de la proteína DsRed en el macrófago es indicativo de la fagocitosis activa de leucocitos rojos procedentes del compañero parabionte. Ambas poblaciones fueron recogidas por sorting de forma separada, fijadas en 2% PFA y preparadas con medio de montaje para microscopía de fluorescencia con DAPI (Vectashield, Vector Laboratories).

La adquisición de imágenes se realizó en el microscopio Zeiss Axiovert 200M y el software Axiovision (Zeiss) con un objetivo 40x de inmersión en aceite.

En algunos experimentos, se realizó un cytospin o aplastado celular con la centrífuga Cytospin 4 Cytocentrifuge (Thermo Scientific) y las células se marcaron con tinción Wright-Giemsa (Sigma).

Detección de células productoras de CXCL12 por inmunofluorescencia

Para la detección de células productoras de CXCL12 los tejidos se prepararon como se ha destacado en apartado anterior. En este caso, los tejidos se cortaron a 8 μm en criostato (Leica CM1850) y se conservaron a -80°C hasta su utilización. Las muestras fueron bloqueadas como se ha mencionado anteriormente. A continuación, se incubaron las muestras con anticuerpo de rata anti-ratón para el antígeno CD31 (eBiosciences) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar las muestras, se añadió el anticuerpo secundario anti-rata conjugado con el fluorocromo Alexa-Fluor546 (Invitrogen). Finalmente, las muestras fueron montadas con Vectashield con DAPI y selladas con laca de uñas.

Para el marcaje de secciones de médula ósea femoral, se utilizaron animales *Cxcl12^{Gfp}* previamente inyectados por vía venosa con neutrófilos DsRed purificados de médula ósea ($3,5 \times 10^6$). Entre 6-8 horas después los animales fueron perfundidos con 2% PFA y tibia y fémures fueron fijados durante 18 horas en PFA a 4°C . A continuación, las muestras fueron rehidratadas en sucrosa al 30% durante 48 horas y congeladas en OCT. La médula femoral se cortó en crio secciones longitudinales de 5 μm de espesor utilizando criostato. Las secciones se bloquearon con PBS con 10% de suero de burro y el kit de bloqueo biotina/avidina (Vectashield) y posteriormente fueron marcadas con anticuerpos de rata anti-CD169 (Abcam), seguido de anticuerpo biotinilado anti-rata IgG y estreptavidina conjugada con el fluorocromo DyLight649 (Jackson ImmunoResearch).

Análisis mediante laser scanning cytometry

La técnica *laser scanning cytometry* permite estudiar múltiples parámetros relacionados con los valores de fluorescencia de células individuales presentes en un tejido complejo tras tinción por inmunofluorescencia (236). Además, permite establecer relaciones espaciales entre los distintos componentes celu-

lares analizados y obtener datos cuantitativos de estas conexiones.

Para ello, se empleó una plataforma de adquisición de imagen iCys Research Imaging Cytometer system (CompuCyte) equipada con 4 láseres (405, 488, 561 y 633 nm) y 4 detectores con filtros 450/40, 521/15, 575/50 y 650/LP. Las secciones se escanearon con un objetivo 10x y láser de 405 nm para obtener imágenes de baja resolución de los núcleos teñidos con DAPI y así obtener una imagen general de la médula ósea. En el siguiente análisis, las regiones de interés fueron escaneadas con un objetivo en seco 40x con una resolución espacial de 0,25 mm por cada sección para crear imágenes de alta resolución. El ajuste del voltaje de los detectores se realizó con controles sin marcar y de isotipo escaneados en paralelo. Las distancias entre neutrófilos y hueso, así como entre neutrófilos y macrófagos, se cuantificaron utilizando el software iCys (CompuCyte).

10. ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS Y CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS A TEJIDOS

Migración de neutrófilos a tejidos

Leucocitos procedentes de la sangre de donantes *Tg-DsRed*, *Fut7^{-/-}* y MR4 se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las células de ratones experimentales y WT fueron mezcladas en las mismas proporciones e inyectadas por vía intravenosa en recipientes *Tg-Gfp* o *LysM^{Gfp}*. 3 horas después los animales fueron perfundidos con PEB para eliminar las células en circulación y se recogieron muestras de sangre (antes de la perfusión), hígado, bazo y médula ósea. Se prepararon suspensiones celulares de todos los órganos y las células se incubaron con el anticuerpo Ly6G (clon 1A8) conjugado con DyLight649 para su análisis por citometría de flujo. La mezcla transferida a los animales recipientes se usó como control para calcular el ratio esperado en los tejidos analizados.

Migración de células madre hematopoyéticas a médula ósea (Homing)

Ratones WT control y previamente tratados con anti-Ly6G (1A8) fueron inyectados con 107 células totales de médula ósea (vía intravenosa) procedentes de un donante *Tg-DsRed*. 2 horas después, los animales fueron sacrificados y las células de la médula ósea de los fémures se tiñeron con los anticuerpos

para la detección de células LSK por citometría de flujo. El número total de células LSK que habían migrado a médula ósea se obtuvo con el porcentaje obtenido en el citómetro corregido por la celularidad total de los 2 fémures.

Migración y fagocitosis de neutrófilos Ly6G⁺ CD62L^{LO} y CD62L^{HI}

Los neutrófilos CD62L^{LO} y CD62L^{HI} fueron purificados de la sangre de animales PEdKO y WT tratados con AMD3100, respectivamente. Las células fueron marcadas con 10 μ M 5(6)-Carboxyfluoresceína diacetato N-succinimidil ester (CFSE; Invitrogen) a una concentración de $7,5 \times 10^6$ células/ml en PBS-BSA al 0,1% durante 10 minutos a 37°C. Ratones WT fueron inyectados con la misma cantidad de neutrófilos CD62L^{LO} y CD62L^{HI} marcados con CFSE y después de 4 horas los animales fueron sacrificados. A continuación, se prepararon suspensiones celulares de médula ósea y se marcaron con anticuerpos contra F4/80 y Gr-1 para su posterior análisis por citometría de flujo. Los neutrófilos que habían migrado a médula ósea se definieron como Gr-1^{HI}F4/80^{LO/NEG}CFSE⁺. Los macrófagos fueron identificados como Gr-1^{NEG}F4/80⁺ y definidos como fagocíticos si presentaban una señal positiva para CFSE. Se utilizaron ratones no inyectados como control para definir las poblaciones de interés.

11. ENSAYOS DE DETECCIÓN DE NEUTRÓFILOS IN VIVO

Biotinilación in vivo

El marcaje *in vivo* de neutrófilos se realizó en animales WT inyectados con 1 mg de sulfo-NHS-biotina (Sigma) en PBS por vía intravenosa. 1 hora después se extrajo sangre de los recipientes y tras la lisis de eritrocitos, se incubó con anticuerpos anti-Ly6G y CD62L. Tras el lavado de las células con PEB durante 5 minutos a 4°C de temperatura y centrifugación a 160 g, se procedió a un segundo marcaje con estreptavidina conjugada con el fluorocromo Alexa450 antes del análisis por citometría de flujo.

Marcaje metabólico con 5-Br-deoxiUridina (BrdU)

Para el marcaje de precursores granulocíticos se empleó 5-Br-deoxiUridina (BrdU) un análogo del nucleótido timidina, a una dosis de 2.5 mg/ratón por vía intraperitoneal (BD Biosciences). Los animales fueron tratados anteriormente con anticuerpos bloqueantes de selectinas endoteliales P y E para

bloquear la extravasación de neutrófilos como se ha descrito anteriormente (Tabla 5). Muestras de sangre fueron extraídas a los tiempos indicados, lisadas e incubadas con los anticuerpos contra Ly6G y CD62L. A continuación, las células se fijaron y permeabilizaron durante 15 minutos con las soluciones propias del kit BD Pharmingen BrdU Flow Kit (BD). Tras el lavado de las células con la solución correspondiente del kit las células fueron tratadas con enzima DNase (300 µg/ml en DPBS 1 hora a 37°C) para exponer el BrdU incorporado al DNA. Finalmente las células fueron marcadas intracelularmente con el anticuerpo anti-BrdU conjugado con el fluorocromo APC siguiendo las instrucciones del fabricante.

Anticuerpo	Compañía	Dosis	Vía administración
Selectina P	BioXcell	2 dosis de 12,5 µg/ratón	Intravenoso
Selectina E	BioXcell	2 dosis de 12,5 µg/ratón	Intravenoso
Ly6G	BioXcell	2 dosis de 50 µg/ratón	Intraperitoneal
CD4	BD Biosciences	2 dosis de 50 µg/ratón	Intraperitoneal
CD154 (ICAM1)	BioXcell	2 dosis de 50 µg/ratón	Intravenoso
G-CSF	BioXcell	2 dosis de 50 µg/ratón	Intravenoso
IL-17	BioXcell	125 µg/ratón	Intravenoso

Tabla 5: Anticuerpos purificados para el bloqueo o la eliminación de células en ensayos in vivo.

12. ENSAYOS DE MOVILIZACIÓN DE HSPC Y BLOQUEO IN VIVO

Para la movilización de HSPC usamos los siguientes protocolos:

Con neutrófilos:

Neutrófilos derivados de médula ósea y/o sangre fueron inyectados intravenosamente en ratones WT y *Fut7^{-/-}* a ZT13 con las dosis indicadas. La sangre y los tejidos fueron recogidos a ZT1 y/o ZT5.

Con AMD3100:

El AMD3100 es un antagonista del receptor CXCR4 que induce movilización de HSPC y de neutrófilos (159). Para la movilización con AMD3100 (Tocris), los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una dosis de 2.5 mg/kg en PBS a ZT5 y la sangre fue recogida 1 hora después.

Con GW3965:

La administración del agonista de receptores nucleares LXR, GW3965 (201), se realizó en animales ayunados 4 horas antes de la inyección intraperitoneal del compuesto inyectado a ZT13 a una dosis de 10 mg/kg disuelto en 10% de DMSO y PBS.

Con clodronato:

Animales WT fueron inyectados con 250 μ l de liposomas cargados con clodronato (facilitados en colaboración con el Dr. Nico van Rooijen) a ZT15. La sangre fue recogida 14 horas después a ZT5 (149).

Con anticuerpo contra ICAM-1:

Animales WT, *Fut7*^{-/-} y PEdKO fueron inyectados con 50 μ g de rIgG o anticuerpo contra ICAM-1 a ZT5 y sangrados a ZT13 (mismo día) y a ZT5 del día siguiente (es decir, 24h después del tratamiento, Tabla 5). En otros experimentos una única dosis de 100 μ g de anticuerpo contra ICAM-1 fue utilizada manteniendo las mismas horas de recogida de sangre.

Con anticuerpo contra G-CSF:

Animales WT, *Fut7*^{-/-} y PEdKO fueron inyectados con 50 μ g de rIgG ó anticuerpo contra G-CSF en dos dosis espaciadas 24 horas entre sí a ZT17 (Tabla 5). Los animales fueron sangrados al tercer día, a ZT5 y ZT13.

Con α IL-17:

Para el bloqueo con el anticuerpo contra IL-17, ratones *Fut7*^{-/-} fueron inyectados intravenosamente con una única dosis del anticuerpo bloqueante (Tabla 5). Los animales fueron sangrados al día siguiente a ZT5 y ZT13.

En los experimentos en los que evaluamos fluctuaciones circadianas de leucocitos y HSPC, los mismos animales fueron sangrados a distintos tiempos, ZT5 y ZT13. En estos experimentos el análisis estadístico es pareado. Los niveles de leucocitos en sangre fueron medidos en el contador hematológico Abacus (Diatron) perteneciente a la Unidad del Animalario del CNIC. En la Tabla 5 se recoge una tabla resumen de los anticuerpos utilizados *in vivo* para el bloqueo o la eliminación de las células de interés.

13. ELIMINACIÓN DE CÉLULAS IN VIVO

Para la inducir la eliminación de neutrófilos en circulación se utilizaron 50 μ g de anticuerpo anti-Ly6G (clon 1A8) inyectados intraperitonealmente durante 2 días consecutivos (Tabla 5). Este protocolo redujo un 90% el número de neutrófilos en circulación (637 ± 41 en el grupo control, frente a 55 ± 12 neutrófilos/ μ l en el grupo tratado con el anticuerpo). Los niveles de linfocitos y monocitos en sangre así como los niveles de macrófagos y neutrófilos en médula ósea, no se vieron afectados por este tratamiento. La eliminación de linfocitos CD4⁺ se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito para neutrófilos usando un anticuerpo contra CD4 (clon GK1.5), alcanzando una reducción del 65% de linfocitos en circulación (2108 ± 297 grupo control frente a 717 ± 85 células/ μ l grupo tratado con anti-CD4).

Para la eliminación de macrófagos de médula ósea, 100-150 μ l de liposomas cargados con clodronato fueron inyectados por vía intravenosa 10 días antes de realizar el experimento. La eficiencia del tratamiento fue confirmada por citometría de flujo a día 11. En los experimentos de parabiosis, los animales fueron analizados 5 días después de la inyección.

Para eliminar macrófagos que expresan la sialoadhesina CD169, usamos ratones que expresan el receptor de la difteria tóxica humana bajo el promotor del gen Siglec-1 codificante para CD169. Estos ratones fueron tratados con difteria tóxica a una dosis de 10 mg/kg por vía intraperitoneal, 48 horas antes del análisis. El tratamiento indujo la eliminación específica de macrófagos de médula ósea sin afectar otras poblaciones mieloides en este tejido.

14. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS CXCL12-GFP⁺

Para los ensayos de proliferación de células que producen CXCL12 se inyectó BrdU diluido en PBS intraperitonealmente (2.5 mg/ratón) en ratones *Cxcl12^{Gfp}* previamente tratados con anticuerpo anti-Ly6G siguiendo el protocolo indicado (Tabla 5). Los huesos y la médula ósea se digirieron con liberasa/DNasa I y las células obtenidas se analizaron para la incorporación de BrdU por citometría de flujo como se ha indicado anteriormente. Las células productoras de CXCL12 en ciclo se identificaron como BrdU⁺.

15. MICROSCOPÍA INTRAVITAL DE MÉDULA ÓSEA EN CALVARIA

Microscopía intravital de epifluorescencia

Los ratones experimentales se prepararon para la adquisición de imágenes de la médula ósea de calvaria mediante microscopía de fluorescencia multicanal como se ha descrito previamente (237). Brevemente, los animales fueron anestesiados con ketamina/xilacina y se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm en la región superior del cráneo. A continuación, se colocó un adaptador de plástico circular para separar la piel y mantener el área de imagen expuesta y húmeda con suero fisiológico durante toda la duración del procedimiento. Los bordes de este adaptador y la piel del cráneo fueron sellados con vaselina. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Axio Examiner (Zeiss) equipado con una cámara Coolsnap HQ2 y analizadas con el software Slide Book (Intelligent Imaging Innovations). 5x10⁶ de promielocíticas 32D fueron marcadas con CFSE e inyectadas en ratones recipientes control o cuyos neutrófilos habían sido eliminados de circulación (tratamiento con anti-Ly6G) como se ha indicado anteriormente (Tabla 5). Esperamos 4 horas antes de la adquisición de imágenes para asegurar una migración eficiente de las células a médula ósea. Para la visualización de los vasos sanguíneos se inyectó rodamina 6G (10 µg/ratón, Sigma). Inmediatamente después, se cuantificó el número de células 32D adheridas a los sinusoides por campo de visión.

Microscopía intravital multifotón

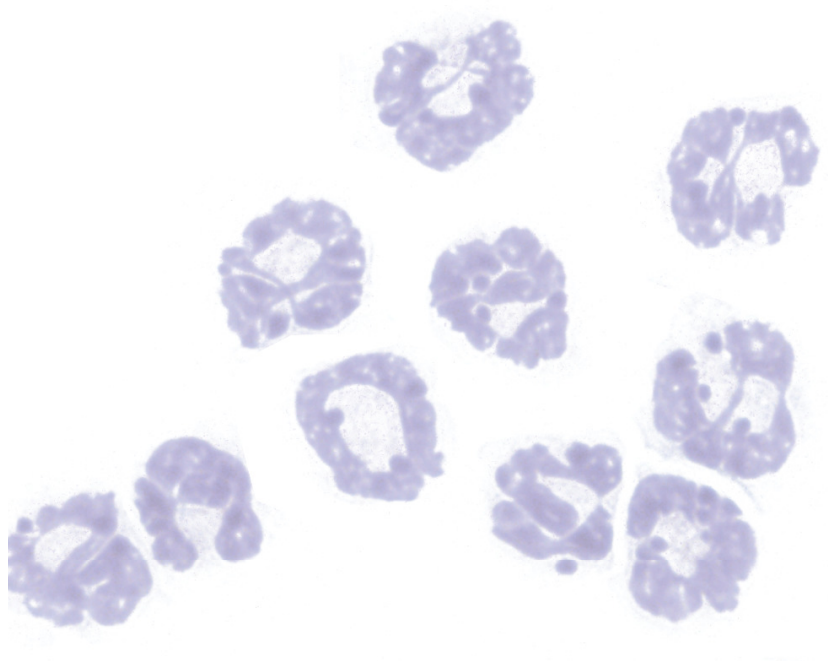
Animales *Cxcl12^{Gfp}* fueron anestesiados e inmovilizados para la adquisición de imágenes en calvaria usando un microscopio Zeiss LSM780 (Zeiss). 30 minutos antes de la adquisición de imágenes los animales fueron inyectados con 2-5x10⁶ neutrófilos DsRed⁺ derivados de sangre y/o médula ósea. 50 µg de dextrano conjugado con el fluorocromo Alexa647 (10kDa, Invitrogen) se inyectaron intravenosamente para permitir la visualización inicial de la vasculatura. Pasados 30 minutos el dextrano permite la visualización de macrófagos ya que es activamente eliminado por estas células. Áreas enriquecidas en células que expresan niveles altos de CXCL12 (células CAR) y macrófagos (dextrano positivas) fueron seleccionadas para la adquisición de imágenes. En otro grupo de experimentos, células 32D fueron marcadas con Vibrant DiD (Invitrogen) e inyectadas intravenosamente junto con dextrano conjugado

con el fluorocromo TRITC (70 kDa, Sigma). La señal procedente del láser segundo armónico (Ti:Sapphire láser, Spectra-Physics Mai Tai Deep Sea) se utilizó para la detección de fibras de colágeno como se ha descrito anteriormente (238).

16. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos recogidos en los experimentos se han representado como valores medios \pm error estándar de la media. Todos los parámetros analizados siguen distribuciones normales según el análisis efectuado con el test D'Agostino-Pearson. El test para el análisis multivariante ANOVA y el test de Dunnett se utilizaron para comparaciones de más de 2 grupos, y el test t de Student pareado o no pareado, cuando el análisis se realizó entre 2 grupos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Excel o GraphPad. El nivel de significancia estadística (*) se estableció en $p \leq 0,05$. P valores $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***), así como diferencias no significativas (n.s.) aparecen indicados en los pies de figura según corresponda.

Bibliografía



1. Medzhitov R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435.
2. Cooper MD, Alder MN. (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815-822.
3. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (Garland Science, New York, ed. 5th, 2001).
4. Janeway CA, Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13.
5. Spits H, Di Santo JP. (2011) The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* **12**, 21-27.
6. Geissmann F, Jung S, Littman DR. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82.
7. Hashimoto D, Miller J, Merad M. (2011) Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* **35**, 323-335.
8. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* **14**, 986-995.
9. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. (2013) Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008748.
10. Nagata S. (2007) Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol Rev* **220**, 237-250.
11. Kohyama M, Ise W, Edelson BT, Wilker PR, Hildner K, Mejia C, Frazier WA, Murphy TL, Murphy KM. (2009) Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* **457**, 318-321.
12. Edwards JR, Mundy GR. (2011) Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* **7**, 235-243.
13. Odegaard JI, Chawla A. (2008) Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4**, 619-626.
14. Zarbock A, Ley K. (2009) New insights into leukocyte recruitment by intravital microscopy. *Curr Top Microbiol Immunol* **334**, 129-152.
15. Mestas J, Hughes CC. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* **172**, 2731-2738.
16. Nathan C, Ding A. (2010) Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871-882.
17. Soehnlein O, Lindbom L. (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**, 427-439.
18. Chovatiya R, Medzhitov R. (2014) Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell* **54**, 281-288.

19. Schiwon M, Weisheit C, Franken L, Gutweiler S, Dixit A, Meyer-Schwesinger C, Pohl JM, Maurice NJ, Thiebes S, Lorenz K, Quast T, Fuhrmann M, Baumgarten G, Lohse MJ, Opdenakker G, Bernhagen J, Bucala R, Panzer U, Kolanus W, Grone HJ, Garbi N, Kastenmuller W, Knolle PA, Kurts C, Engel DR. (2014) Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell* **156**, 456-468.
20. Lemke G. (2013) Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a009076.
21. Metchnikoff E, in *Lectures on the comparative pathology of inflammation; delivered at the Pasteur Institute in 1891*, M. D. Starling, Ed. (Dover Publications, New York, 1968), pp. 106–153.
22. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**, 890-898.
23. Griffith TS, Ferguson TA. (2011) Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. *Immunity* **35**, 456-466.
24. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. (2002) G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* **17**, 413-423.
25. Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM. (1961) Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* **40**, 989-995.
26. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109-1121.
27. Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. (2005) Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* **202**, 1599-1611.
28. Baldridge MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. (2010) Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature* **465**, 793-797.
29. Heidt T, Sager HB, Courties G, Dutta P, Iwamoto Y, Zaltsman A, von Zur Muhlen C, Bode C, Frischione GL, Denninger J, Lin CP, Vinegoni C, Libby P, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. (2014) Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nat Med* **20**, 754-758.
30. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A. (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118-1129.

31. Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. (1998) CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* **18**, 4301-4314.
32. Bainton DE, Ulliyot JL, Farquhar MG. (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* **134**, 907-934.
33. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. (2010) In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* **116**, 625-627.
34. Teich JM, Young IT, Sher SE, Lee JS. (1979) Transformation of nuclear morphology during cellular maturation. *J Histochem Cytochem* **27**, 193-198.
35. Manz MG, Boettcher S. (2014) Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol* **14**, 302-314.
36. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. (2006) Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* **24**, 801-812.
37. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. (2001) Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* **294**, 1933-1936.
38. Granick JL, Falahee PC, Dahmubed D, Borjesson DL, Miller LS, Simon SI. (2013) Staphylococcus aureus recognition by hematopoietic stem and progenitor cells via TLR2/MyD88/PGE2 stimulates granulopoiesis in wounds. *Blood* **122**, 1770-1778.
39. Kim MH, Liu W, Borjesson DL, Curry FR, Miller LS, Cheung AL, Liu FT, Isseroff RR, Simon SI. (2008) Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J Invest Dermatol* **128**, 1812-1820.
40. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF. (2010) CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest* **120**, 1192-1203.
41. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, Ryan RJ, Iwamoto Y, Marinelli B, Gorbato R, Forghani R, Novobrantseva TI, Koteliensky V, Figueiredo JL, Chen JW, Anderson DG, Nahrendorf M, Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ. (2012) Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2491-2496.
42. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbato R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T, Majmudar MD, Lasitschka F, Etzrodt M, Waterman P, Waring MT, Chicoine AT, van der Laan AM, Niessen HW, Piek JJ, Rubin BB, Butany J, Stone JR, Katus HA, Murphy SA, Morrow DA, Sabatine MS, Vinegoni C, Moskowitz MA, Pittet MJ, Libby P, Lin CP, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. (2012) Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* **487**, 325-329.
43. Zhao JL, Ma C, O'Connell RM, Mehta A, DiLoreto R, Heath JR, Baltimore D. (2014) Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and proge-

nitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **14**, 445-459.

44. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG. (2011) Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* **34**, 590-601.

45. Boettcher S, Ziegler P, Schmid MA, Takizawa H, van Rooijen N, Kopf M, Heikenwalder M, Manz MG. (2012) Cutting edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells. *J Immunol* **188**, 5824-5828.

46. Boettcher S, Gerosa RC, Radpour R, Bauer J, Ampenberger F, Heikenwalder M, Kopf M, Manz MG. (2014) Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* **124**, 1393-1403.

47. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. (2003) Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* **111**, 187-196.

48. Richards MK, Liu F, Iwasaki H, Akashi K, Link DC. (2003) Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood* **102**, 3562-3568.

49. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. (1994) Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* **84**, 1737-1746.

50. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC. (1996) Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* **5**, 491-501.

51. Basu S, Hodgson G, Zhang HH, Katz M, Quilici C, Dunn AR. (2000) "Emergency" granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood* **95**, 3725-3733.

52. Zhan Y, Lieschke GJ, Grail D, Dunn AR, Cheers C. (1998) Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood* **91**, 863-869.

53. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tenen DG. (2006) C/EBPβ is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* **7**, 732-739.

54. Satake S, Hirai H, Hayashi Y, Shime N, Tamura A, Yao H, Yoshioka S, Miura Y, Inaba T, Fujita N, Ashihara E, Imanishi J, Sawa T, Maekawa T. (2012) C/EBPβ is involved in the amplification of early granulocyte precursors during candidemia-induced "emergency" granulopoiesis. *J Immunol* **189**, 4546-4555.

55. Hortner M, Nielsch U, Mayr LM, Johnston JA, Heinrich PC, Haan S. (2002) Suppressor of cytokine signaling-3 is recruited to the activated granulocyte-colony stimulating

factor receptor and modulates its signal transduction. *J Immunol* **169**, 1219-1227.

56. Kreisel D, Sugimoto S, Tietjens J, Zhu J, Yamamoto S, Krupnick AS, Carmody RJ, Gelman AE. (2011) Bcl3 prevents acute inflammatory lung injury in mice by restraining emergency granulopoiesis. *J Clin Invest* **121**, 265-276.

57. Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsher DW, Golub TR, Tenen DG. (2001) c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol* **21**, 3789-3806.

58. Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, Timchenko NA. (2001) C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell* **8**, 817-828.

59. Kolaczowska E, Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159-175.

60. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D, Hashimoto D, Merad M, Frenette PS. (2012) Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* **37**, 290-301.

61. Wagner DD, Frenette PS. (2008) The vessel wall and its interactions. *Blood* **111**, 5271-5281.

62. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743-6751.

63. Vestweber D, Blanks JE. (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79**, 181-213.

64. McEver RP, Zhu C. (2010) Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 363-396.

65. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. (2007) Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* **26**, 477-489.

66. Sundd P, Gutierrez E, Koltsova EK, Kuwano Y, Fukuda S, Pospieszalska MK, Groisman A, Ley K. (2012) 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature* **488**, 399-403.

67. Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, Coggeshall KM, McEver RP. (2010) E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood* **116**, 485-494.

68. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-689.

69. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. (2006) Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* **203**, 2569-2575.

70. Voisin MB, Nourshargh S. (2013) Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun* **5**, 336-347.
71. Vestweber D. (2012) Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability. *Ann NY Acad Sci* **1257**, 184-192.
72. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Bruhl ML, Gartner F, Khandoga AG, Legate KR, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg S. (2013) Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* **14**, 41-51.
73. Abtin A, Jain R, Mitchell AJ, Roediger B, Brzoska AJ, Tikoo S, Cheng Q, Ng LG, Cavanagh LL, von Andrian UH, Hickey MJ, Firth N, Weninger W. (2014) Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. *Nat Immunol* **15**, 45-53.
74. Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE, Rowe D, Nourshargh S. (2012) Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med* **209**, 1219-1234.
75. Germain RN, Robey EA, Cahalan MD. (2012) A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science* **336**, 1676-1681.
76. Rossaint J, Zarbock A. (2013) Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. *J Innate Immun* **5**, 348-357.
77. Scoazec JY, Feldmann G. (1994) The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* **20**, 296-300.
78. Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K. (1993) Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3. *Am J Pathol* **142**, 481-488.
79. Wong J, Johnston B, Lee SS, Bullard DC, Smith CW, Beaudet AL, Kubes P. (1997) A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* **99**, 2782-2790.
80. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* **330**, 362-366.
81. Grommes J, Soehnlein O. (2011) Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* **17**, 293-307.
82. Wiggs BR, English D, Quinlan WM, Doyle NA, Hogg JC, Doerschuk CM. (1994) Contributions of capillary pathway size and neutrophil deformability to neutrophil transit through rabbit lungs. *J Appl Physiol* (1985) **77**, 463-470.
83. Stadtmann A, Zarbock A. (2012) CXCR2: From Bench to Bedside. *Front Immunol* **3**, 263.

84. Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH. (2000) Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity* **12**, 665-676.
85. Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. (1998) Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14423-14428.
86. Bugl S, Wirths S, Muller MR, Radsak MP, Kopp HG. (2012) Current insights into neutrophil homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* **1266**, 171-178.
87. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. (2013) What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol* **94**, 595-601.
88. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* **31**, 318-324.
89. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, Link DC. (2005) G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* **106**, 3020-3027.
90. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. (2003) Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* **19**, 583-593.
91. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. (2010) CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest* **120**, 2423-2431.
92. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. (2010) The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* **33**, 387-399.
93. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. (2008) Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* **452**, 442-447.
94. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. (1996) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* **184**, 1101-1109.
95. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. (1999) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* **283**, 845-848.
96. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. (1994) Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2305-2309.
97. Devi S, Wang Y, Chew WK, Lima R, N AG, Mattar CN, Chong SZ, Schlitzer A, Bakocevic N, Chew S, Keeble JL, Goh CC, Li JL, Evrard M, Malleret B, Larbi A, Renia L, Haniffa M, Tan SM, Chan JK, Balabanian K, Nagasawa T, Bachelier F, Hidalgo A, Ginhoux F, Kubes P, Ng LG. (2013) Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibi-

tion arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J Exp Med* **210**, 2321-2336.

98. Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. (1998) The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* **91**, 4523-4530.

99. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, Bernhardt G, Lipp M. (1998) Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol* **160**, 1522-1531.

100. Kowalska MA, Ratajczak J, Hoxie J, Brass LF, Gewirtz A, Poncz M, Ratajczak MZ. (1999) Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol* **104**, 220-229.

101. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. (2009) CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* **113**, 4711-4719.

102. Burdon PC, Martin C, Rankin SM. (2008) Migration across the sinusoidal endothelium regulates neutrophil mobilization in response to ELR + CXC chemokines. *Br J Haematol* **142**, 100-108.

103. Suratt BT, Petty JM, Young SK, Malcolm KC, Lieber JG, Nick JA, Gonzalo JA, Henson PM, Worthen GS. (2004) Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* **104**, 565-571.

104. Kohler A, De Filippo K, Hasenberg M, van den Brandt C, Nye E, Hosking MP, Lane TE, Mann L, Ransohoff RM, Hauser AE, Winter O, Schraven B, Geiger H, Hogg N, Gunzer M. (2011) G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* **117**, 4349-4357.

105. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. (2011) The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol* **89**, 359-372.

106. Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM, Worthen GS. (2001) Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L913-921.

107. Furze RC, Rankin SM. (2008) Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* **125**, 281-288.

108. Rankin SM. (2010) The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol* **88**, 241-251.

109. Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K. (2002) Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **71**, 711-717.

110. Furze RC, Rankin SM. (2008) The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* **22**, 3111-3119.
111. Saverymuttu SH, Peters AM, Keshavarzian A, Reavy HJ, Lavender JP. (1985) The kinetics of 111indium distribution following injection of 111indium labelled autologous granulocytes in man. *Br J Haematol* **61**, 675-685.
112. Thakur ML, Lavender JP, Arnot RN, Silvester DJ, Segal AW. (1977) Indium-111-labeled autologous leukocytes in man. *J Nucl Med* **18**, 1014-1021.
113. Weiblen BJ, Forstrom L, McCullough J. (1979) Studies of the kinetics of indium-111-labeled granulocytes. *J Lab Clin Med* **94**, 246-255.
114. Arranz L, Sanchez-Aguilera A, Martin-Perez D, Isern J, Langa X, Tzankov A, Lundberg P, Muntion S, Tzeng YS, Lai DM, Schwaller J, Skoda RC, Mendez-Ferrer S. (2014) Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature* **512**, 78-81.
115. Lucas D, Scheiermann C, Chow A, Kunisaki Y, Bruns I, Barrick C, Tessarollo L, Frenette PS. (2013) Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration. *Nat Med* **19**, 695-703.
116. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. (2007) Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* **129**, 1081-1095.
117. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merckenslager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. (2010) Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852-857.
118. Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25.
119. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. (1977) Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* **91**, 335-344.
120. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. (1975) The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* **46**, 65-72.
121. Taichman RS, Emerson SG. (1994) Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* **179**, 1677-1682.
122. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846.
123. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841.

124. Mendelson A, Frenette PS. (2014) Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med* **20**, 833-846.
125. Morrison SJ, Scadden DT. (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327-334.
126. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS. (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **502**, 637-643.
127. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**, 635-638.
128. Ding L, Morrison SJ. (2013) Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231-235.
129. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettepelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC. (2013) CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227-230.
130. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-462.
131. Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, Joe GJ, Hexner E, Choi Y, Taichman RS, Emerson SG. (2007) Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* **109**, 3706-3712.
132. Chan CK, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, Helms JA, Kuo CJ, Kraft DL, Weissman IL. (2009) Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* **457**, 490-494.
133. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324-336.
134. Ugarte F, Forsberg EC. (2013) Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions. *EMBO J* **32**, 2535-2547.
135. Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M. (2013) Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell* **12**, 737-747.
136. Song J, Kiel MJ, Wang Z, Wang J, Taichman RS, Morrison SJ, Krebsbach PH. (2010) An in vivo model to study and manipulate the hematopoietic stem cell niche. *Blood* **115**, 2592-2600.
137. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**, 331-340.
138. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA,

- Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834.
139. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. (2013) Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol* **31**, 285-316.
140. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M, Mizoguchi T, Bruns I, Kunisaki Y, Frenette PS. (2013) PDGFRalpha and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med* **210**, 1351-1367.
141. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. (2014) Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* **15**, 154-168.
142. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988.
143. Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS, Bonner B, Chiu VK, Nolan DJ, Shido K, Benjamin L, Rafii S. (2010) Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* **12**, 1046-1056.
144. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, Jacobsen RN, Forristal CE, Patton JT, Magnani JL, Levesque JP. (2012) Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med* **18**, 1651-1657.
145. Doan PL, Himburg HA, Helms K, Russell JL, Fixsen E, Quarmyne M, Harris JR, Deoliviera D, Sullivan JM, Chao NJ, Kirsch DG, Chute JP. (2013) Epidermal growth factor regulates hematopoietic regeneration after radiation injury. *Nat Med* **19**, 295-304.
146. Himburg HA, Harris JR, Ito T, Daher P, Russell JL, Quarmyne M, Doan PL, Helms K, Nakamura M, Fixsen E, Herradon G, Reya T, Chao NJ, Harroch S, Chute JP. (2012) Pleiotrophin regulates the retention and self-renewal of hematopoietic stem cells in the bone marrow vascular niche. *Cell Rep* **2**, 964-975.
147. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. (2006) Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**, 407-421.
148. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. (2011) Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **147**, 1146-1158.
149. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS. (2011) Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* **208**, 261-271.
150. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. (2011) Expression of

the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *J Exp Med* **208**, 251-260.

151. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton IJ, van Rooijen N, Alexander KA, Raggatt LJ, Levesque JP. (2010) Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **116**, 4815-4828.

152. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. (2009) Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259-263.

153. Omatsu Y, Seike M, Sugiyama T, Kume T, Nagasawa T. (2014) Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature* **508**, 536-540.

154. Olson TS, Caselli A, Otsuru S, Hofmann TJ, Williams R, Paolucci P, Dominici M, Horwitz EM. (2013) Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood* **121**, 5238-5249.

155. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, Scheiermann C, Schiff L, Poncz M, Bergman A, Frenette PS. (2014) Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*,

156. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, Ahamed J, Li L. (2014) Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*,

157. Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. (2004) Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* **2**, E75.

158. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Kollnberger M, Tubo N, Moseman EA, Huff IV, Junt T, Wagers AJ, Mazo IB, von Andrian UH. (2007) Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* **131**, 994-1008.

159. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, Liles WC, Li X, Graham-Evans B, Campbell TB, Calandra G, Bridger G, Dale DC, Srouf EF. (2005) Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* **201**, 1307-1318.

160. Smith-Berdan S, Nguyen A, Hassanein D, Zimmer M, Ugarte F, Ciriza J, Li D, Garcia-Ojeda ME, Hinck L, Forsberg EC. (2011) Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell* **8**, 72-83.

161. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. (2000) The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* **95**, 3289-3296.

162. Hidalgo A, Sanz-Rodriguez F, Rodriguez-Fernandez JL, Albella B, Blaya C, Wright N, Cabanas C, Prosper F, Gutierrez-Ramos JC, Teixeira J. (2001) Chemokine stromal

- cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **29**, 345-355.
163. Nie Y, Han YC, Zou YR. (2008) CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* **205**, 777-783.
164. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. (2002) G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* **3**, 687-694.
165. Bonig H, Priestley GV, Nilsson LM, Jiang Y, Papayannopoulou T. (2004) PTX-sensitive signals in bone marrow homing of fetal and adult hematopoietic progenitor cells. *Blood* **104**, 2299-2306.
166. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, Traver D, van Rooijen N, Weissman IL. (2009) CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* **138**, 271-285.
167. Cardier JE, Barbera-Guillem E. (1997) Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **26**, 165-175.
168. Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, Koh GY. (2010) Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **115**, 957-964.
169. McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. (2002) Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1341-1346.
170. Halberg F, Halberg E, Barnum CP, Bittner JJ, *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals* (American Association for the Advancement of Science, 1959), pp. 803-878.
171. Edgar RS, Green EW, Zhao Y, van Ooijen G, Olmedo M, Qin X, Xu Y, Pan M, Valekunja UK, Feeney KA, Maywood ES, Hastings MH, Baliga NS, Merrow M, Millar AJ, Johnson CH, Kyriacou CP, O'Neill JS, Reddy AB. (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* **485**, 459-464.
172. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307-320.
173. Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**, 78-83.
174. Druz D, de Juan A, Scheiermann C. (2014) Circadian rhythms in leukocyte trafficking. *Semin Immunopathol* **36**, 149-162.
175. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. (2010) The mammalian circadian timing sys-

tem: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* **72**, 517-549.

176. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. (2014) Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* **40**, 178-186.

177. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH, Farrow SN, Else KJ, Singh D, Ray DW, Loudon AS. (2012) The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 582-587.

178. Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk HD, Kramer A, Maier B. (2009) A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21407-21412.

179. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. (2013) Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* **341**, 1483-1488.

180. Silver AC, Arjona A, Walker WE, Fikrig E. (2012) The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity* **36**, 251-261.

181. Yu X, Rollins D, Ruhn KA, Stubblefield JJ, Green CB, Kashiwada M, Rothman PB, Takahashi JS, Hooper LV. (2013) TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* **342**, 727-730.

182. Maestroni GJ, Cosentino M, Marino F, Togni M, Conti A, Lecchini S, Frigo G. (1998) Neural and endogenous catecholamines in the bone marrow. Circadian association of norepinephrine with hematopoiesis? *Exp Hematol* **26**, 1172-1177.

183. Mendez-Ferrer S, Chow A, Merad M, Frenette PS. (2009) Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* **16**, 235-242.

184. Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS. (2008) Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell* **3**, 364-366.

185. Tsinkalovsky O, Filipski E, Rosenlund B, Sothorn RB, Eiken HG, Wu MW, Claus-trat B, Bayer J, Levi F, Laerum OD. (2006) Circadian expression of clock genes in purified hematopoietic stem cells is developmentally regulated in mouse bone marrow. *Exp Hematol* **34**, 1249-1261.

186. Shi PA, Isola LM, Gabilove JL, Moshier EL, Godbold JH, Miller LK, Frenette PS. (2013) Prospective cohort study of the circadian rhythm pattern in allogeneic sibling donors undergoing standard granulocyte colony-stimulating factor mobilization. *Stem Cell Res Ther* **4**, 30.

187. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. (2013) Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* **13**, 190-198.

188. Arjona A, Silver AC, Walker WE, Fikrig E. (2012) Immunity's fourth dimension: approaching the circadian-immune connection. *Trends Immunol* **33**, 607-612.

189. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**, 285-294.
190. Hong C, Kidani Y, N AG, Phung T, Ito A, Rong X, Ericson K, Mikkola H, Beaven SW, Miller LS, Shao WH, Cohen PL, Castrillo A, Tontonoz P, Bensinger SJ. (2012) Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J Clin Invest* **122**, 337-347.
191. Westerterp M, Gourion-Arsiquaud S, Murphy AJ, Shih A, Cremers S, Levine RL, Tall AR, Yvan-Charvet L. (2012) Regulation of hematopoietic stem and progenitor cell mobilization by cholesterol efflux pathways. *Cell Stem Cell* **11**, 195-206.
192. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. (2014) The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe* **15**, 526-536.
193. Van Eeden SF, Bicknell S, Walker BA, Hogg JC. (1997) Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. *Am J Physiol* **272**, H401-408.
194. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* **83**, 64-70.
195. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. (1996) Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* **84**, 563-574.
196. Maly P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB. (1996) The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* **86**, 643-653.
197. Lawrence DW, King SB, Frazier WA, Koenig JM. (2009) Decreased CD47 expression during spontaneous apoptosis targets neutrophils for phagocytosis by monocyte-derived macrophages. *Early Hum Dev* **85**, 659-663.
198. Haus E, Lakatua DJ, Swoyer J, Sackett-Lundeen L. (1983) Chronobiology in hematology and immunology. *Am J Anat* **168**, 467-517.
199. Sauer B, Henderson N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5166-5170.
200. N AG, Bensinger SJ, Hong C, Beceiro S, Bradley MN, Zelcer N, Deniz J, Ramirez C, Diaz M, Gallardo G, de Galarreta CR, Salazar J, Lopez F, Edwards P, Parks J, Andujar M, Tontonoz P, Castrillo A. (2009) Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* **31**, 245-258.
201. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, Parks DJ, Wilson JG, Tippin TK, Binz JG, Plunket KD, Morgan DG, Beaudet EJ, Whitney KD, Kliewer SA, Willson TM. (2002) Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* **45**, 1963-1966.

202. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* **8**, 265-277.
203. Forlow SB, Schurr JR, Kolls JK, Bagby GJ, Schwarzenberger PO, Ley K. (2001) Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood* **98**, 3309-3314.
204. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. (1996) T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* **183**, 2593-2603.
205. Borregaard N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657-670.
206. McGettrick HM, Lord JM, Wang KQ, Rainger GE, Buckley CD, Nash GB. (2006) Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. *J Leukoc Biol* **79**, 779-788.
207. Allen C, Thornton P, Denes A, McColl BW, Pierozynski A, Monestier M, Pinteaux E, Rothwell NJ, Allan SM. (2012) Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA. *J Immunol* **189**, 381-392.
208. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **16**, 183-194.
209. Gallin JI. (1984) Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood* **63**, 977-983.
210. Hirsch JG. (1959) Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. *Bacteriol Rev* **23**, 48-60.
211. Rocha-Perugini V, Gonzalez-Granado JM. (2014) Nuclear envelope lamin-A as a coordinator of T cell activation. *Nucleus* **5**,
212. Rowat AC, Jaalouk DE, Zwerger M, Ung WL, Eydelnant IA, Olins DE, Olins AL, Herrmann H, Weitz DA, Lammerding J. (2013) Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions. *J Biol Chem* **288**, 8610-8618.
213. Sanchez-Martin L, Estechea A, Samaniego R, Sanchez-Ramon S, Vega MA, Sanchez-Mateos P. (2011) The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood* **117**, 88-97.
214. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. (1989) Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* **245**, 1238-1241.
215. Ivanov, II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay

- BB, Littman DR. (2008) Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* **4**, 337-349.
216. Hiemstra IH, Beijer MR, Veninga H, Vrijland K, Borg EG, Olivier BJ, Mebius RE, Kraal G, den Haan JM. (2014) The identification and developmental requirements of colonic CD169(+) macrophages. *Immunology* **142**, 269-278.
217. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S. (2004) Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* **304**, 1147-1150.
218. Papayannopoulou T. (2004) Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* **103**, 1580-1585.
219. Demetri GD, Griffin JD. (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* **78**, 2791-2808.
220. Chow A, Brown BD, Merad M. (2011) Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol* **11**, 788-798.
221. Schmid MA, Takizawa H, Baumjohann DR, Saito Y, Manz MG. (2011) Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood* **118**, 4829-4840.
222. Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, Zhou AY, Yu Y, Weiser JN. (2010) Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* **16**, 228-231.
223. Bugl S, Wirths S, Radsak MP, Schild H, Stein P, Andre MC, Muller MR, Malenke E, Wiesner T, Marklin M, Frick JS, Handgretinger R, Rammensee HG, Kanz L, Kopp HG. (2013) Steady-state neutrophil homeostasis is dependent on TLR4/TRIF signaling. *Blood* **121**, 723-733.
224. Gallo RL, Hooper LV. (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* **12**, 503-516.
225. Perretti M, D'Acquisto F. (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* **9**, 62-70.
226. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693-704.
227. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. (2004) The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* **200**, 1145-1156.
228. Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T. (2000) Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* **96**, 719-726.
229. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. (2004) JunB deficiency leads to a myelopro-

liferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* **119**, 431-443.

230. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**, 313-319.

231. Vintersten K, Monetti C, Gertsenstein M, Zhang P, Laszlo L, Biechele S, Nagy A. (2004) Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis* **40**, 241-246.

232. Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. (2004) Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* **469**, 311-324.

233. Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts-Meek S, Hultgren B, Wood WI, Moore MW. (1994) Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* **265**, 682-684.

234. Dzhagalov I, St John A, He YW. (2007) The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* **109**, 1620-1626.

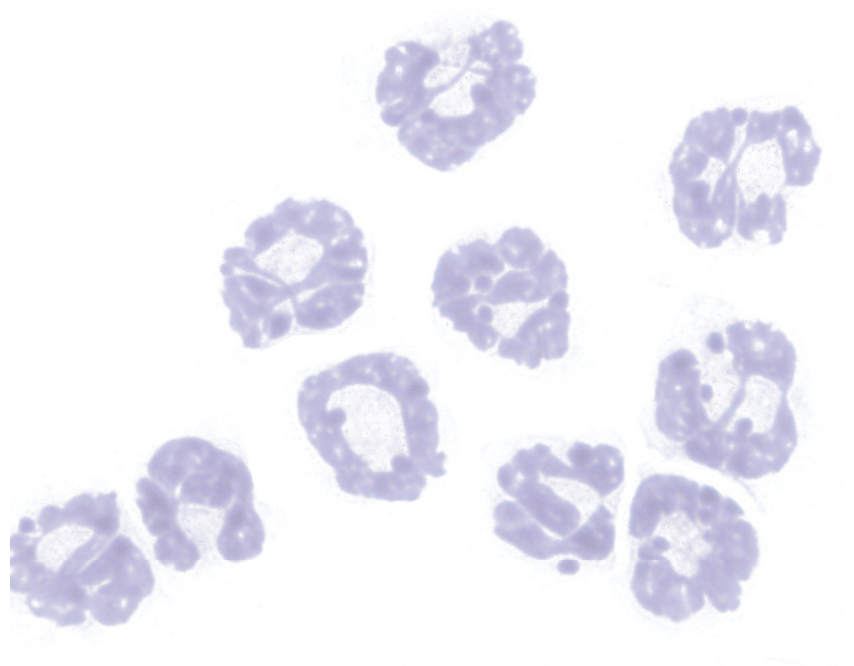
235. Scharffetter-Kochanek K, Lu H, Norman K, van Nood N, Munoz F, Grabbe S, McArthur M, Lorenzo I, Kaplan S, Ley K, Smith CW, Montgomery CA, Rich S, Beaudet AL. (1998) Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* **188**, 119-131.

236. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, Park SY, Lu J, Protopopov A, Silberstein LE. (2013) Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* **15**, 533-543.

237. Hidalgo A, Weiss LA, Frenette PS. (2002) Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally. *J Clin Invest* **110**, 559-569.

238. Lo Celso C, Lin CP, Scadden DT. (2011) In vivo imaging of transplanted hematopoietic stem and progenitor cells in mouse calvarium bone marrow. *Nat Protoc* **6**, 1-14.

Anexos



ANEXO I: ABREVIATURAS

M.O	Médula ósea
CD	Clúster de diferenciación
HSPC	Célula madre y progenitor hematopoyético
MSC	Célula madre mesenquimal
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
FBS	Suero fetal bovino
BSA	Albúmina de suero bovino
GFP	Proteína verde fluorescente
DNA	Ácido dexosirribonucleico
IL	Interleuquina
PMN	Leucocito polimorfonuclear
PBS	Tampón fosfato alcalino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	PCR inversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SDS	Sulfato dodecyl de sodio
TNF	Factor de necrosis tumoral
ROS	Especies reactivas de oxígeno
LXR	Receptores X hepáticos
ABCA	Proteína transportadora de la familia de unión a ATP tipo cassette
MERTK	Proteína quinasa tirosina MER
LPS	Lipopolisacárido

TAM	Familia de los receptores Axl, Tyro-3 y Mer
TLR	Familia de los receptores TLR, Toll-like receptors
PRR	Familia de los receptores PRR, Pattern-recognition receptors
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligro, Danger-associated molecular patterns
MFGE-8	Milk fat globule-EGF factor 8
CXCR	Receptor de quimioquina tipo CXC
CXCL	Ligando de quimioquina tipo CXC
DMSO	Dimetil sulfóxido
RPMI	Medio de cultivo celular desarrollado en Roswell Park Memorial Institute
HRP	Peroxidasa de rábano
WB	Western-blot
IHQ	Inmunohistoquímica
PFA	Paraformaldehído
Ig	Inmunoglobulina
NHS	N-hidroxisuccinimida
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
CFU-C	Unidades formadoras de colonias en cultivo
ZT	Zeitgeber time, tiempo tras un determinado estímulo
CFSE	5(6)-Carboxyfluoresceína diacetato N-succinimidil ester
TGF	Factor de crecimiento tumoral
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
SCF	Factor de células madre

ANEXO II: PUBLICACIONES

1. **Casanova-Acebes M**, N AG, Weiss LA, Hidalgo A. (2014) Innate immune cells as homeostatic regulators of the hematopoietic niche. *Int J Hematol* **99**, 685-694.
2. **Casanova-Acebes M**, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chevre R, N AG, Kunisaki Y, Zhang D, van Rooijen N, Silberstein LE, Weber C, Nagasawa T, Frenette PS, Castrillo A, Hidalgo A. (2013) Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* **153**, 1025-1035.